



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Facultad de Ciencias de la Vida

Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL
EN GENOTIPOS DE QUÍNOA CHILENA (*Chenopodium quinoa* Willd.) USANDO
MICROSATÉLITES**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de

Magíster en Biotecnología

Co-Director de tesis: Dr. Claudio Meneses

Centro de Biotecnología Vegetal

Facultad de Ciencias de la Vida

Universidad Andrés Bello

Co-Director de tesis: Dr. Andrés Zurita

Centro de Investigación Regional Intihuasi

Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA)

VERÓNICA ELISA ARENAS MORALES

Santiago- Chile

2018



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Facultad de Ciencias de la Vida

Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL
EN GENOTIPOS DE QUÍNOA CHILENA (*Chenopodium quinoa* Will.) USANDO
MICROSATÉLITES**

VERÓNICA ELISA ARENAS MORALES

Este trabajo fue realizado bajo la supervisión del Director de Tesis Dr. Claudio Meneses en el Laboratorio de Genética y Genómica en Plantas, Centro de Biotecnología Vegetal, Universidad Andrés Bello, aprobado por los miembros de la comisión de evaluación.

Dr. Claudio Meneses
Co-Director de Tesis

Dr. Adrián Moreno
Comisión de Tesis

Dr. Andrés Zurita
Co-Director de Tesis

Dr. Mauricio González
Comisión de Tesis

Santiago- Chile

2018

Dedicada a Sergio y a la Noe.

AGRADECIMIENTOS

Resumir en un par de páginas a quienes han sido partícipes, tanto directa como indirectamente, de este proceso no es tan fácil como parece. Quiero partir dando las infinitas gracias a mis papás. Imagino que no han sido fáciles estos 27 años, pero creo que lo han hecho bien. Gracias por confiar en mí y sobre todo por apoyarme en la decisión de estudiar esta carrera. Gracias por ayudarme a superar mis miedos, inseguridades y frustraciones. Si pudiera elegirlos de nuevo como papás lo haría sin dudarlo porque son los más pulentos que pude haber pedido.

Gracias a mi familia. A mis tías, a la Noe, mi tía María, mi tía Edith y mi tía Elsa, tío Jaime, tío Checho y tío Pepe; que sin entender lo que estudié siempre me alentaron a seguir adelante sin importar qué obstáculos se me interpusieran en el camino, aportando con su granito en lo que fue este proceso. Gracias a mis primos y primas, a la Nené y la Pame que han sido las hermanas que no tuve. La Karen que ha sido ejemplo de perseverancia por seguir los sueños. Al Tomás que es como mi hermano chico a quien no podía defraudar.

A los que no están y siempre confiaron en mí. A mi Tata, mi Weli y Segio. Gracias por enseñarme a enfrentar las adversidades y sacar la fortaleza de éstas. Gracias por regalarme y fundirme siempre. Gracias por permitirme amarlos el tiempo que estuvieron conmigo.

Al ser hija de profesores no puedo dejar de agradecer a aquellos docentes que a lo largo de toda mi formación dejaron su huella. A la tía Clarita que siempre me preguntó qué era lo que había estudiado y quizás sin entender mucho siempre me alentó. A los profes que me inculcaron la rigurosidad al trabajar y la disciplina. La Termi, Jauré, la Miss Carmen, la srta. Ma. Angélica Figueroa, la srta. Lucía. Gracias a ellos soy lo que soy.

Gracias a los amigos y amigas que han estado siempre ahí. Xino, Nino, Mario, Juan; gracias por soportarme siempre y por alentarme a seguir adelante. Gracias a mis amigas infalibles que me dejó el liceo. Natalia, Sara, Caro, Coni y Caro M., gracias por soportar mis idas y venidas, mis desapariciones y re-apariciones. Gracias a la Oriana que ha sido una gran amiga por más de 10 años, porque me enseñó el significado de luchar sin importar el motivo.

Recuerdo que cuando entré a la universidad mi mamá un día me dijo que a medida que uno crecía, menos amigos era capaz de conocer. Quiero decirle ahora a mi mamá que probablemente se equivocó. En la universidad conocí a gente increíble que no puedo dejar de reconocer. A mi amiga que estuvo presente desde el inicio de esta hazaña, gracias Fran por ser mi cable a tierra, mi compañera y amiga durante todos estos años. Gracias a quienes estuvieron en un principio, pero la vida nos llevó por caminos diferentes, al Marco y al Diego por hacer de nuestros primeros años de universitarios los mejores. Al Pancho y la Sofi por enseñarnos que el que la sigue la consigue. Gracias a los amigos que fueron apareciendo después, la Vale, la Maca, la Pao, Juan, Cris, Lucho, Maxi. En fin, gracias por la simpatía y la empatía siempre. Gracias por las noches de desvelo que tuvimos para pasar los ramos y las que tuvimos para celebrar el haberlos pasado.

Gracias a los buenos amigos que conocí en el laboratorio. Carlitos, Susana, Karin, SebaBorisLazloCalifornia, Tomás, Gabifli: nuestros viajes a Rapel fueron increíbles, gracias por los buenos momentos que compartimos. Gracias a los chicos de postcosecha por soportarme durante el verano; Pato, Pelao, Baltasar, Troy y Xava. Gracias a Le Susanné, Yeipí, Llonie, Eisier, Dani, Yusta y Nacho por estar presentes en el final de este trabajo sacando más de una “risotá”, sobre todo con el cambio de edificio.

Gracias infinitas a la Liss por estar presente durante todo este largo proceso, en las buenas y en las no tanto. Gracias por los momentos bacanes que vivimos durante estos 4 años que hemos estado en el grupo. Por apañar en todas, por las risas y las frustraciones que me ayudaste a superar. Gracias por ser una amiga excepcional, te re quiero cotita... Grrrr jajajaja.

No puedo dejar de mencionar a Paulina. Pulín, la Pau, Paulina Andrea jajaja. No eres una amiga cualquiera, eres una de las más grandes. Gracias por ser un soporte fundamental en este proceso. Por tener siempre tiempo para escuchar, aconsejar e incluso retar. Gracias infinitas por hacer mis días más alegres, por compartir nuestras tonteras y nuestros ataques de risa en los momentos menos adecuados. En fin, si me pusiera a agradecer todo terminaríamos las 2 llorando. Te adoro amiga.

Muchas gracias a la gente del grupo CM. A la Cata y Claudio por la buena onda dentro del equipo. A Miguel por ser parte importante en este trabajo y por ayudarme con los programas de análisis. A Gerardo por su rigurosidad y presión que me ayudaron a sacar

adelante esta tesis. A la Ale por inculcarnos la perseverancia, responsabilidad y la pasión por el trabajo. Fueron una parte fundamental en este trabajo.

Gracias a mi tutor, Dr. Claudio Meneses por confiar en mí en todo momento y apoyarme en este trabajo. Gracias por las reuniones motivacionales y el buen humor siempre, por estar alentándonos cuando todo se torna confuso. Gracias por todo jefe. Gracias también al Dr. Andrés Zurita por la confianza entregada al momento de realizar este trabajo, y por tener siempre la disposición a ayudarme a sacarlo adelante.

Por último, y no por eso menos especial, quiero agradecer a mi compañero de travesía. Ricardo. Gracias por haber estado conmigo en los momentos más estresantes de este trabajo. Gracias por brindarme cobijo, por apapacharme y sobre todo por siempre sacarme una risotada de esas tan delicadas que conoces. Gracias a don Daniel y la sra. Mónica, a la Dani, Roro, Cris, Balti y Anita (enana) por ser mi segunda familia.

¡Gracias infinitas por todo a todos!

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	3
ABREVIACIONES	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Antecedentes generales	7
1.2 Antecedentes históricos del cultivo	7
1.3 Distribución del cultivo de quínoa	8
1.4 Propiedades de la quínoa	9
1.5 Programas de mejoramiento genético	11
1.6 Marcadores moleculares	12
1.7 Diversidad genética	13
1.8 Estructura poblacional	14
2. HIPÓTESIS	16
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo general	16
3.2 Objetivos específicos	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 Material Vegetal	17
4.2. Análisis de datos fenotípicos	17
4.3 Extracción de DNA genómico y análisis de integridad	18
4.4 Análisis de marcadores microsatélites	18
4.5 Análisis de diversidad genética y estructura poblacional	22
5. RESULTADOS	23
5.1 Análisis de diversidad fenotípica	23
5.2 Extracción de DNA genómico y análisis de integridad	27
5.3 Selección de marcadores SSR para genotipificación de líneas seleccionadas de quínoa	27
5.4 Estimación de la diversidad genética y estructura poblacional en líneas seleccionadas de quínoa	30
6. DISCUSIÓN	36
6.1 Análisis de diversidad fenotípica	36
6.2 Diversidad genética presente en líneas seleccionadas del germoplasma de quínoa	38
6.3 Estructura poblacional de las líneas seleccionadas de quínoa	40

7. CONCLUSIONES.....	42
8. REFERENCIAS	43
ANEXO	52

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Listado de partidores utilizados para la genotipificación de los individuos de quínoa.....	19
Tabla 2. Análisis de correlación entre los caracteres de quínoa analizados.....	25
Tabla 3. Microsatélites utilizados para la genotipificación de 96 líneas seleccionadas del banco de germoplasma de quínoa	30
Figura 1. Análisis de componentes principales (PCA) de los caracteres de quínoa en las 96 líneas de selección avanzada.....	22
Figura 2. Análisis de correlación fenotípica de las líneas seleccionadas de quínoa.....	24
Figura 3. Gel de integridad del DNA.....	26
Figura 4. Genotipificación de líneas seleccionadas de quínoa.....	28
Figura 5. Genotipificación de la población de las líneas seleccionadas de quínoa.....	29
Figura 6. Estimación de diversidad genética de las líneas seleccionadas de quínoa.....	32
Figura 7. Estimación de la estructura poblacional en las líneas seleccionadas de quínoa.....	33
Figura 8. Representación de estructura poblacional obtenida en el territorio de colección de las líneas seleccionadas.....	35

ABREVIACIONES

DNA	“Deoxyribonucleic Acid”, Ácido desoxirribonucleico
EF1 α	“Elongation Factor 1 alpha”, Factor de Elongación 1 alfa
FAO	“Food and Agriculture Organization of the United Nations”, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
INIA	Instituto de Investigaciones Agropecuarias
MAS	“Marker Assisted Selection”, Selección Asistida por Marcadores
NGS	“Next Generation Sequencing”
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
pb	Pares de bases
PCA	“Principal Component Analysis”, Análisis de Componentes Principales
PCR	“Polimerase Chain Reaction”, Reacción en Cadena de la Polimerasa
PIC	“Polymorphism Information Content”, Contenido de Información Polimórfica
PMG	Programa de Mejoramiento Genético
SSR	“Simple Sequence Repeat” Repeticiones de Secuencia Corta

RESUMEN

La quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) es un importante cultivo originario de la región andina de América del Sur y es considerada como una fuente primaria de proteínas por los pueblos originarios de estas regiones. La variabilidad genética existente en esta especie permitiría explicar su amplia adaptación a diferentes ambientes. Sin embargo, existen muy pocas variedades comerciales en el país que permitan su cultivo intensivo bajo distintas condiciones. Por esto, el objetivo de este trabajo fue estimar la diversidad genética y estructura poblacional en líneas de selección avanzada de quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) usando microsatélites. Para esto, se analizaron 14 caracteres fenotípicos y 24 microsatélites, obtenidos de bases de datos públicas, para determinar la diversidad fenotípica y genotípica dentro de las 96 líneas de selección avanzadas del programa de mejoramiento genético de quínoa de INIA (Chile), respectivamente. Un análisis multivariado de componentes principales de los datos fenotípicos no mostró grupos entre las accesiones. Mediante la genotipificación con SSR (del inglés “Simple Sequence Repeat”) se obtuvieron en total 114 alelos con un promedio de 4,75 alelos por *locus*. La heterocigosidad obtenida fue de 0,24 mientras que en promedio el PIC fue de 0,40. El análisis de estructura poblacional arrojó un total de 3 subpoblaciones presentes en las líneas de selección de quínoa correspondientes a los ecotipos Salares, Costero/ “Lowlands” y un tercer ecotipo de Centro-Sur Costero/ “Lowlands”. Los resultados obtenidos en este trabajo son de gran importancia para futuros programas de mejoramiento genético y el desarrollo de herramientas genómicas en quínoa.

ABSTRACT

Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) is an important crop originating in the Andean region of South America and is considered as a primary source of protein by the indigenous inhabitants of these regions. The genetic variability existing in this specie would explain its wide adaptation to different environments. However, there are very few commercial varieties in Chile that allow its extensive cultivation. For this reason, the aim of this work has to estimate the genetic diversity and population structure in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) advanced selection lines using microsatellites. We analyzed 14 phenotypic characters and 24 microsatellites obtained from public databases to determine the phenotypic and genotypic diversity within the 96 selection lines from quinoa breeding genetic program of INIA (Chile), respectively. A multivariate analysis of principal components of the phenotypic data did not show groups between the accessions. By genotyping with SSR ('Simple Sequence Repeat') a total of 114 alleles were obtained with an average of 4.75 alleles per locus. The obtained heterozygosity was 0.24 while on average the PIC was 0.40. The population structure analysis showed a total of 3 subpopulations present in the quinoa selection lines corresponding to the Salares, Coastal / Lowlands ecotypes and a third Coastal-South Coastal / Lowlands ecotype. The results obtained in this work are of great importance for future programs of genetic improvement and the development of genomic tools in quinoa.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes generales

La quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) es un aquenio considerado un pseudocereal de hábito anual, dicotiledónea, perteneciente a la familia de las Amarantáceas al igual que otras especies de importancia económica como la remolacha o la espinaca (Zurita-Silva *et al.*, 2014). El genoma de esta planta es alotetraploide ($2n = 4x = 36$), el cual fue recientemente secuenciado reportándose un tamaño de 1,39 Gpb con un total de 3.486 “scaffolds” (Jarvis *et al.*, 2017).

Respecto al origen de la quínoa existen diversas hipótesis que sostienen que se desarrolló en el cordón montañoso de los Andes hace más de 7000 años (Bazile *et al.*, 2014; Jacobsen *et al.*, 2003). Sin embargo, la evidencia más reciente apunta a que se habría originado en los alrededores del Lago Titicaca en lo que hoy corresponde al altiplano de Perú y Bolivia (Dillehay *et al.*, 2007). Otro antecedente que destaca respecto al origen de la planta, es que podría ser un híbrido resultante de dos ancestros diploides del género *Chenopodium* de los que aún no se tiene certeza a qué especies corresponden (Von Baer *et al.*, 2009).

1.2 Antecedentes históricos del cultivo

Existe evidencia arqueológica en diferentes zonas de Sudamérica que sugiere el consumo de esta semilla por los pueblos precolombinos. Autores mencionan el hallazgo de quínoa en momias tan antiguas como las de la cultura Chinchorro en el norte de Chile (Towle, 1961). Asimismo, historiadores del siglo pasado relatan en sus escritos que en diversos pueblos de lo que hoy es Colombia, sus habitantes consumieron de manera abundante esta semilla, ya que debido a las bajas temperaturas era muy escaso el maíz que lograba cultivarse. Se menciona, además, que en el siglo XVI el primer historiador en viajar a la Isla de Chiloé, Cortés Hoguea, encontró siembras de quínoa en este lugar. Es más, en el siglo XVII el sacerdote jesuita Antonio Mechoni, relata que los araucanos cultivaban quínoa tan al sur como a orillas del lago Nahuel Huapi, ubicado en la Patagonia Argentina (Mechoni, 1747).

Sin embargo, no se tiene certeza de cómo fue la domesticación del cultivo ni de cómo se distribuyó por estos pueblos.

Pedro de Valdivia fue el primer español que menciona este cultivo en el viejo mundo, relatando que los indios consumían de manera abundante maíz, papa y quínoa. Existen antecedentes de exportación de quínoa del nuevo mundo, sin embargo, dado su alto parecido al bledo (*Amaranthus blitum* L.), este cultivo no recibió la atención suficiente como para propagarse en Europa en la época de la colonia (Tapia, 2013).

Los colonizadores europeos del siglo XV trajeron consigo granos como el trigo a Sudamérica. Este nuevo cultivo hizo que poco a poco la quínoa fuese perdiendo importancia agronómica en zonas con ambientes mediterráneos. Es por esta razón, que países con un clima más hostil para estos granos, como Bolivia y Perú, siguieron teniendo a la quínoa como cultivo importante en su dieta (Tapia, 2013).

1.3 Distribución del cultivo de quínoa

Este grano es el principal cultivo andino produciéndose más que cereales como el arroz, trigo o maíz en esta región (Jacobsen, 2003). Los mayores productores y exportadores de quínoa a nivel mundial son Perú y Bolivia (Del Castillo *et al.*, 2007). Desde los primeros estudios realizados en este cultivo se ha visto que la quínoa crece en altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 4.000 metros (González *et al.*, 2011; Zurita-Silva *et al.*, 2014). El cultivo de quínoa se encuentra principalmente en la región andina Sudamericana, extendiéndose desde el norte de Colombia hasta la Araucanía en Chile. La plasticidad que presenta la quínoa genera ventajas adaptativas respecto a otros cultivos frente al cambio climático. Las adaptaciones de la quínoa a diversos ambientes ha hecho que se clasifique en cinco ecotipos (Fuentes *et al.*, 2012) que corresponden a:

1. Quínoa de los Valles Interandinos la cual se produce en Perú, Ecuador y Colombia.
2. Quínoa del Altiplano Norte la cual se ubica en Bolivia y Perú.
3. Quínoa de las Yungas o selva, propio de Bolivia.

4. Quínoa de los Salares o del Altiplano Sur la cual es producida en Bolivia, Chile y Argentina.
5. Quínoa de la Costa o de nivel del mar que corresponde a la quínoa que se produce en Chile central y sur.

1.4 Propiedades de la quínoa

La quínoa se destaca principalmente por sus propiedades nutricionales. Investigaciones sobre la quínoa como cultivo precolombino señalan que los Incas llegaron a reemplazar el consumo de proteína animal por esta semilla (Jacobsen *et al.*, 2003; Pulvento *et al.*, 2012). Se ha descrito que en países andinos en vías de desarrollo el consumo de quínoa es crucial para combatir los altos niveles de desnutrición infantil (Jacobsen, 2003; Mujica y Jacobsen 2006). De la misma manera, se ha determinado que el grano contiene todos los aminoácidos esenciales e incluso sus niveles son superiores a los patrones de referencia de la FAO, la OMS y la ONU (Stikic *et al.*, 2012) y es posible usar todas las partes de la planta como alimento.

Otro antecedente relevante se relaciona con las propiedades medicinales que posee. Estudios culturales enfocados en este cultivo señalan que la planta se usaba por los pueblos precolombinos para tratar inflamaciones, heridas e incluso fracturas (Vega-Gálvez *et al.*, 2010). Investigaciones recientes han mostrado que el consumo de quínoa en niños de 4 a 6 años aumenta los niveles de la hormona IGF-1 involucrada en el crecimiento durante la infancia (Graf *et al.*, 2015). Asimismo, se ha comprobado en pacientes celíacos que una dieta constante de quínoa mejora los parámetros gastrointestinales relacionados con esta enfermedad como la pérdida de peso causada por diarrea crónica (Zevallos *et al.*, 2014; Graf *et al.*, 2015). Otras publicaciones recientes señalan que la quínoa también tendría un efecto antidiabético aunque esto se ha demostrado sólo de manera experimental en animales (Graf *et al.*, 2014). Otro índice que corrobora el potencial de la quínoa como alimento funcional es el alto nivel de antioxidantes. Se ha determinado una relación entre el color de la semilla con el contenido y actividad antioxidante de éstas, siendo las semillas oscuras más altas en estos compuestos, con una mayor actividad antioxidante que las semillas claras (Gawlik-Dziki *et*

al., 2013; Tang *et al.*, 2015). Además, se ha reportado que los extractos de hojas de quínoa tienen diversos efectos en células involucradas en cáncer prostático, inhibiendo su proliferación, motilidad y comunicación mediada por uniones gap (Gawlik-Dziki *et al.*, 2013).

Otra cualidad que se ha destacado de la planta es la capacidad que tiene para crecer en condiciones desfavorables, sometida a estrés hídrico y salinidad. Se ha demostrado experimentalmente que la quínoa es tolerante al suelo seco durante estadios críticos como llenado de semilla, lo cual sugiere que se puede potenciar este cultivo durante períodos de sequía (González *et al.*, 2011). Asimismo, se ha demostrado que existen genotipos de quínoa más tolerantes a la salinidad, viéndose diferencias tanto a nivel fenotípico como a nivel de expresión génica en plantas germinadas y cultivadas bajo estas condiciones (Bonales-Alatorre *et al.*, 2013; Ruiz-Carrasco *et al.*, 2011). Los diferentes genotipos de quínoa también han presentado diferencias en la tolerancia al frío. Se ha demostrado que un contenido superior de azúcares solubles, junto con el contenido proteico en plantas de quínoa, podría influir en la tolerancia a este estrés (Bendevis *et al.*, 2013; Jacobsen *et al.*, 2007). Respecto a la resistencia a estrés biótico, se ha demostrado que ésta podría incluso combatir *Botrytis cinerea* debido a la presencia de saponinas, por lo que variedades con mayor contenido de este compuesto serían más resistentes (Stuardo y San Martín, 2008).

Tal ha sido el interés en la planta que en los últimos años se han enfocado recursos para cultivarla en países europeos y asiáticos (Bazile *et al.*, 2016; Bhargava *et al.*, 2007). Partiendo por Reino Unido, la quínoa se distribuyó luego a Dinamarca y Holanda. Otros países también contemplan a Brasil, México, Estados Unidos, India y China donde se han llevado a cabo numerosos experimentos, incluidos programas de mejoramiento genético (Jacobsen, 2003).

1.5 Programas de mejoramiento genético

Se define a los programas de mejoramiento genético como el conjunto de técnicas destinadas a mejorar una o más características genéticas de un cultivo (Hartung y Schiemann, 2014). Durante los últimos años, se han destinado recursos para llevar a cabo estos programas en quínoa dadas las propiedades ya mencionadas. Los países que lideran estos programas son Bolivia, Perú y Estados Unidos (Fuentes *et al.*, 2009; Von Baer *et al.*, 2009; Zurita-Silva *et al.*, 2014). Las características que buscan los mejoradores en quínoa consisten principalmente en mejorar el rendimiento y potenciar los parámetros nutricionales.

En Chile, entre los años 1960 y 1970 se iniciaron los programas de mejoramiento genético en quínoa. Éstos se centraban en potenciar los parámetros de rendimiento de la planta, así se buscó el desarrollo de variedades con menor cantidad de saponinas, de grano más grande y tallo no ramificado. En la década pasada, sin embargo, el foco del programa de mejoramiento genético se centró en seleccionar plantas que fuesen resistentes a plagas y a la sequía (Fuentes *et al.*, 2009). En la actualidad, el INIA se encuentra desarrollando un PMG en quínoa en todas las zonas de Chile en la que la planta tiene potencial productivo, centrado en fomentar los recursos genéticos locales de esta planta (Alfaro *et al.*, 2015). A nivel mundial, se han llevado a cabo análisis con marcadores para determinar qué variedades serían las más óptimas para ser cultivadas en ambientes de países asiáticos o europeos (Bhargava *et al.*, 2007).

Una de las principales aplicaciones de los marcadores en los programas de mejoramiento se centra en la Selección Asistida por Marcadores (MAS). Esta técnica consiste en identificar uno o más marcadores ligados a un carácter de interés para el mejorador (Jiang, 2013). También, los marcadores moleculares son útiles para estimar la diversidad genética, identificar individuos y pruebas de paternidad o control de cruzamientos dirigidos (Collard *et al.*, 2005).

1.6 Marcadores moleculares

Se define marcador molecular a todo polimorfismo detectable en un grupo de individuos que se hereda de manera mendeliana (Collard *et al.*, 2005). Los marcadores moleculares a nivel de DNA poseen ciertas ventajas por sobre otros tipos como los morfológicos o los bioquímicos. Los marcadores basados en DNA poseen una gran cobertura a nivel de genoma, se pueden analizar en estadios tempranos de desarrollo con muestras de tamaño mínimo y su disponibilidad es prácticamente ilimitada (Ellegren, 2004; Oliveira *et al.*, 2006). Dentro de los marcadores de DNA más utilizados para análisis de diversidad genética se encuentran los microsatélites o SSR (del inglés “Simple Sequence Repeat”), que corresponden a pequeñas secuencias de DNA generalmente no codificante compuestos por motivos de 1 a 6 nucleótidos repetidos en tándem que se encuentran flanqueadas por regiones conservadas en el genoma (Tóth *et al.*, 2000). Los SSR fueron clasificados por Weber (1990) de acuerdo al tipo de repeticiones que presentan. Posteriormente, Smith y Devey (1994) observaron en muestras de *Pinus radiata* la presencia de estas repeticiones y además vieron regiones que tenían más de un tipo de repetición como ‘perfectas-compuestas’. En función de esto, existen tres categorías que contemplan:

1. Repeticiones perfectas. Consiste en una secuencia de repetición que no se ve interrumpida por cualquier otra base que no sea del motivo de repetición como (CA)₁₄.
2. Repeticiones imperfectas. Pueden ser dos o más tipos de repeticiones como (TA)₃₁(CA)₄₆.
3. Repeticiones compuestas. La repetición se encuentra en una zona que parece ser un SSR pero en detalle no lo es, como por ejemplo TATT(TAA)₅AATATAATA.

La característica de éstos marcadores es que son altamente informativos por su naturaleza polimórfica, debido a la alta tasa de polimorfismos respecto al genoma, y su herencia codominante (Gupta *et al.*, 1996; Jarne y Lagoda, 1996; Oliveira *et al.*, 2006). Se ha descrito que las repeticiones más abundantes en plantas son (AT)_n, (GA)_n, (AAG)_n y (AAT)_n.

1.7 Diversidad genética

Una de las definiciones de diversidad genética (DG) más utilizada fue descrita por Brown (1983), quien propuso que la DG se puede considerar como la variación genética entre individuos de una especie, variedad o población. Posteriormente, se hizo énfasis en la diferencia entre biodiversidad y diversidad genética, considerando biodiversidad como la variación dentro de un entorno de seres vivos mientras que la diversidad genética es la variación hereditaria dentro y entre poblaciones de organismos (Rao y Hodgkin, 2002). La extensión y distribución de la diversidad genética de una especie vegetal dependerá de diversos factores como la evolución de ésta y el sistema de mejoramiento al que haya sido expuesta. Asimismo, se consideran factores ecológicos y geográficos, eventos denominados cuellos de botella ocurridos en el pasado y frecuentemente factores humanos (Tilman *et al.*, 1997).

La diversidad de la quínoa está relacionada con los cinco ecotipos mencionados anteriormente. El centro de diversidad genética del cultivo corresponde al altiplano andino central entre Perú y Bolivia que se condice además con su centro de origen (Christensen *et al.*, 2007). Adicionalmente, se ha visto una amplia diversidad de esta planta en cuanto a caracteres como el tipo de crecimiento, la forma de las hojas y los tipos de ramificaciones que posee. Sin embargo las características más variables y que destacan en quínoa son el color de la panoja, la planta y la semilla (Bazile *et al.*, 2014). Análisis con microsatélites han revelado una limitada diversidad de quínoa en países como Argentina y Ecuador relacionada principalmente con el pobre manejo del germoplasma en estas regiones (Christensen *et al.*, 2007; Costa Tártara *et al.*, 2012). Con respecto a la variabilidad genética de la quínoa en Chile, se tienen antecedentes que indican que han sido los propios agricultores indígenas quienes la han mantenido, desde los Aymara por el norte y altiplano hasta los Mapuche en el sur de Chile (Planella *et al.*, 2013). Es por ello que se presenta una amplia variedad morfológica entre las plantas encontradas en los diferentes territorios, probablemente resultante de los diferentes métodos de selección que han tenido los mismos agricultores para optimizar sus cultivos (Zurita-Silva *et al.*, 2014). Sin embargo, y a pesar de los antecedentes que indican esta amplia variabilidad a nivel genético, Chile no usa estos recursos con fines

de mejoramiento debido a la falta de análisis en los germoplasmas originarios de las zonas de cultivo nacionales (Zurita-Silva *et al.*, 2014).

1.8 Estructura poblacional

Los análisis de poblaciones se suelen realizar cuando se tiene por propósito analizar la evolución de una especie a lo largo del tiempo, o cuando se desean clasificar individuos de poblaciones definidas de acuerdo a un origen incierto (Pritchard *et al.*, 2000). Bajo este contexto, se define como estructura genética a la distribución no-aleatoria de alelos o genotipos en espacio o tiempo (Loveless y Hamrick, 1984), la que se ve influenciada fuertemente por el espacio físico donde se encuentran los individuos (Costa Tártara *et al.*, 2012). El objetivo de estos análisis es determinar si el flujo génico de los individuos recorre indiferentemente por todas estas poblaciones o si se encuentra geográficamente fragmentado (Aranzana *et al.*, 2010).

Análisis de estructura en los cultivos o germoplasmas de quínoa cobran relevancia, pues como ya se mencionó previamente, la planta puede crecer en diversos ambientes. Los principales análisis de estructura poblacional de quínoa han sido realizados en las zonas donde se ha observado una mayor diversidad del cultivo (Christensen *et al.*, 2007; Del Castillo *et al.*, 2007; Rodríguez e Isla, 2009). En éstos se ha visto que incluso la quínoa de ecotipo altiplánico estaría fragmentada en subpoblaciones que difieren entre sí por factores como la latitud o la altitud donde han sido cultivadas. Además, grupos estadounidenses también han llevado a cabo investigaciones de esta índole con quínoa y con cultivos relacionados como el amaranto, avena y “kañiwa” (Jimenez *et al.*, 2013; Maughan *et al.*, 2004). Mediante el uso de microsatélites, AFLP y RFLP, Maughan *et al.* (2004) determinó el primer mapa de ligamiento de quínoa y las primeras secuencias de microsatélites para esta planta. Por la complejidad del genoma se obtuvieron 35 grupos de ligamiento con una baja saturación del genoma respecto a las publicaciones similares realizadas en otros cultivos (Li *et al.*, 2014). Estos análisis son una herramienta esencial para futuros programas de mejoramiento de este cultivo.

Para llevar a cabo estos estudios se hace fundamental el análisis de marcadores moleculares con altos niveles de polimorfismos, para así poder determinar parámetros estadísticos que definan diferencias entre los individuos de una misma especie (Pritchard *et al.*, 2000).

Por lo anterior, estimar la diversidad genética y la estructura poblacional de las accesiones disponibles para un programa de mejoramiento tiene un doble propósito. Por una parte, permite establecer relaciones genotípicas entre accesiones de diferente origen y muchas veces con diferente fenotipo. Por la otra, son la base para el desarrollo de información genómica útil para el programa, como por ejemplo en la selección de parentales.

2. HIPÓTESIS

Existe una correlación entre el origen geográfico y la diversidad genotípica y fenotípica en líneas de selección avanzada de quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), provenientes de ecotipos presentes en Chile que son parte del programa de mejoramiento genético de INIA.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estimar la diversidad genética y estructura poblacional en líneas de selección avanzada de quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) usando microsatélites.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Analizar datos fenotípicos de genotipos seleccionados del banco de germoplasma de quínoa.

3.2.2. Genotipificar 96 líneas de selección avanzada de quínoa usando microsatélites detectados mediante electroforesis capilar por detección láser.

3.2.3. Determinar el grado de diversidad genética y estructura poblacional de líneas de selección avanzada de quínoa.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 *Material Vegetal*

Se utilizaron muestras de hojas frescas de 96 líneas seleccionadas de quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) que fueron sembradas en la Parcela Experimental Pan de Azúcar (INIA ‘Intihuasi’) en la región de Coquimbo. Las semillas de estas líneas seleccionadas fueron previamente colectadas entre las regiones de Tarapacá (latitud -19,27) y La Araucanía (latitud -39,81) en Chile y se almacenaron en el Banco Base de Semillas (INIA, Vicuña). Se almacenaron las muestras frescas a -80 °C hasta su uso en el Centro de Biotecnología Vegetal de la Universidad Andrés Bello en Santiago.

4.2. *Análisis de datos fenotípicos*

Se fenotipificaron 14 caracteres con 10 réplicas por línea seleccionada de la parcela experimental. Éstos consideraron emergencia de la plántula, días a floración, madurez fisiológica, hábito de crecimiento, diámetro del tallo, presencia de ramificaciones, tamaño de la planta, forma de la panoja, tamaño de la panoja, color de panoja en floración, color de panoja en madurez fisiológica, diámetro de la panoja, peso fresco de la panoja y peso fresco de la planta, de acuerdo a descriptores establecidos por FAO y colaboradores (2013). Los datos fueron analizados en el Centro de Biotecnología Vegetal (UNAB) para determinar mediante análisis de conglomerados y análisis de componentes principales la diversidad de quínoa existente en la selección de líneas avanzadas del PMG Quínoa de INIA, y la hipotética correlación que habría respecto a la zona de colecta de cada genotipo con el fenotipo que presenta. Para estos análisis se utilizó el programa RStudio (RS Team, 2014).

4.3 Extracción de DNA genómico y análisis de integridad

Las extracciones de material genético de las líneas seleccionadas de quínoa se llevaron a cabo utilizando el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante con las siguientes modificaciones. Se realizó la molienda de forma manual con pistilos plásticos y se realizaron cambios en la etapa de elución, considerando una elución a 60 °C por muestra en un volumen final de 80 µL obtenida por centrifugación a 17.000 x g por 10 min. Los parámetros de rendimiento y calidad de las extracciones fueron medidos por absorbancia a 260 y 280 nm usando el equipo EPOCH (System, BioTek, EE.UU.). Para determinar la integridad del DNA se normalizaron las concentraciones de cada muestra a 20 ng/µL y se hizo electroforesis en gel de agarosa de 1,5 %p/v de concentración con voltaje constante de 90 V durante una hora.

4.4 Análisis de marcadores microsatélites

Se genotipificaron 24 SSR en las 96 líneas seleccionadas avanzadas del PMG Quínoa utilizando los partidores descritos en la Tabla 1. Las reacciones de PCR se realizaron con el mix de PCR GoTaq® Green Master Mix (Promega, EE.UU.) en un volumen final de 10 µL (1X tampón de reacción, 1,5 mM MgCl₂, 0,25 µM partidor *forward*, 0,25 µM partidor *reverse* y 20 ng/µL DNA templado) en placas de PCR de 96 pocillos. El protocolo de amplificación consideró 4 min a 94 °C, 35 ciclos de 40 s a 94 °C, 20 s de hibridación a la temperatura de hibridación de oligonucleótidos calculada para cada par de partidores y 30 s a 72 °C, y finalmente, 5 min a 72 °C. Como control positivo de las reacciones de PCR se usó EF1α de quínoa, previamente descrito por Ruiz-Carrasco *et al.*, 2011. Para la comprobación de amplificación y especificidad de los partidores se utilizaron geles de agarosa al 2,0% corridos por 1 h a 90 V. Finalmente, se utilizó el sistema de electroforesis capilar con detección por fluorescencia Fragment Analyzer™ Automated CE System (Analytical Advanced Technologies, EE.UU.) para la genotipificación de todos los individuos con todos los SSRs seleccionados. Se utilizó un kit de electroforesis para la detección de fragmentos de DNA entre 35 y 500 pb (DNF-900 dsDNA Reagent Kit, 500 reacciones, Analytical Advanced Technologies, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los resultados fueron

analizados por el programa ProSize 2.0 (Analytical Advanced Technologies, EE.UU.) para determinar el número y tamaño de los alelos para cada muestra.

Tabla 1. Listado de partidores a utilizados para la genotipificación de los individuos de quínoa. Se indica el nombre del marcador, la secuencia nucleotídica y la temperatura de hibritación promedio (Tm) de cada par de partidores a usar para la genotipificación del set de individuos de quínoa.

Marcador	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)
QATG12 ^a	F GGCAAACACATGGATCTCAA R CAAACAGCGAAGAGGTTTCC	59,0
QATG19 ^a	F CCAAACAAAGACAATAAGGAAACC R CGAGGTTGAAGGAGATTCCA	63,0
QATG9 ^a	F GACTAATGAACGGATGGAAGC R CCTCCCACATAACCTTCCTCT	63,0
QCA19 ^a	F TTTCATCACTCGACCGTATAGC R AGGGTGACTGTTACACCCAAA	63,0
QCA2 ^a	F TGAGGACACACACACACACAC R GGGACCGTTTAATTCAGCAA	60,0
QCA26 ^a	F TTCCAATACAGCACCCACCTC R TGCAAGCATAACATAAGACAGTCA	62,0
QCA28 ^a	F TGCTCACCCTAGCATTTATACACT R ATGAGACGGAGGGAGCACTA	64,0
QCA37 ^a	F CCGTTCCTCCAGACCAATTC R TCATGAGCCACTTCATACACG	62,0
QCA46 ^a	F GCAGGTAAATCAACCCTTGC R TGCATGATAAACTAAGCAGACGA	62,0
QCA48 ^a	F ACAATACATACATAACCCAATATTCAA R TGGAAATGTCACTATGATTGGA	64,0
QCA5 ^a	F GTGGTTCATGGCTGATCCTT R CTTGCCATCAGGGCATATCT	60,0
QCA57 ^a	F TGCAAGGAAACCATCTTTGG R TGCCTCACAGTCACACCTACA	62,0
QCA58 ^a	F CTCGACCAGCAGGGTCTG R CTAGCTAGGCGTTGCCTGAC	62,0
QCA63 ^a	F GCAGCATCACAGAGCAGAAA R GGTGTAGATTGGGAGCCTGA	60,0
QCA65 ^a	F CCATGCAAGGGAACATATTG R AAGTTCGTTGGCTTGCTGTA	58,0

Tabla 1. Continuación.

Marcador	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)
QCA66 ^a	F AGAGTTCTTACATAAGGGAAGAGT R TTTCCTTTGGTAGTTTCTTGTT	62,0
KAAT037 ^b	F TCAACCTCCGAATCCTATCAA R GGATGCTGATTGGTGGATAAA	60,0
KAAT041 ^b	F TGGGACTTCCATAAGGCAAC R ATATTGCATGTCGAGCACCA	60,0
KCAA006 ^b	F TGGAGCAGGATGATGTGGAG R TTGGAGAAACATACCTTGTTGG	62,0
KCAA011 ^b	F TGAACCCGCTTCAACAATG R CCTTCTTCAAACCTCCGAATCC	60,0
KCAA022 ^b	F CCAATTGCATGCTCCTCATT R AATGCAAACATGGGAGGAGA	58,0
KCAA091 ^b	F TTTGTTGTTGTCGTTGTTGTTG R ATATTGCATGTCGAGCACCA	60,0
KCAA095 ^b	F GCTGGTGGAGTCGAATTGAT R AGCCACTTCCCCTTCTCACT	60,0
KGA165 ^b	F CAAGCATATACCTCCATGTGC R GAAGATATGCTGCCTTGTAATCA	62,0

^aMaughan *et al.*., 2004; ^bJarvis *et al.*., 2008.

4.5 Análisis de diversidad genética y estructura poblacional

Los análisis de diversidad genética se realizaron con el programa InfoGen (Di Rienzo *et al.*, 2008). Para ello se hizo una matriz binaria con los datos de electroforesis capilar de cada SSR y se hizo un análisis de conglomerados que utilizará como variables cada marcador, método jerárquico de encadenamiento promedio (“Average linkage”), y distancia genética Euclídea para obtener un dendrograma. Con el mismo programa y matriz, se realizó un análisis de componentes principales (“PCA” de sus siglas en inglés) utilizando las mismas variables de clasificación previamente mencionadas, utilizando como medida de resumen la media.

La estructura poblacional se obtuvo mediante el programa Structure (Pritchard *et al.*, 2000). Para ello se generó una segunda matriz a partir de los datos de electroforesis capilar considerando la ploidía y zonas de donde fueron colectadas las muestras de quínoa. A diferencia de la primera matriz, ésta debe contener sólo datos de carácter numérico y tiene que ser almacenada en formato de texto. Los análisis se realizaron con 96 líneas seleccionadas individuales consideradas en este trabajo, con los 24 marcadores y considerando valores de “missing data” igual a -9 tal como lo sugiere el desarrollador (Pritchard *et al.*, 2011). Para realizar los análisis, Structure requiere un intervalo de subpoblaciones a analizar, denominado k , y una cantidad de iteraciones determinadas por el usuario. Para este trabajo de tesis se usó un intervalo de k de 2 a 15 como lo sugiere el manual y 20 iteraciones por cada valor de k . Posterior a este primer análisis se determinó el mejor valor de k con el sitio web “Structure Harvester”. Se repitió el análisis de Structure con el valor de k obtenido ± 1 , es decir, si el k óptimo fue 5 se repitió el análisis considerando valores de k de 4, 5 y 6. Esta vez se hizo una sola iteración con parámetros de ejecución más restrictivos.

Los estadísticos propios de diversidad genética como heterocigosidad esperada y obtenida de cada locus, número de alelos esperados y obtenidos por locus y contenido de información polimórfica se determinaron usando el programa TETRASAT (Markwith *et al.*, 2006). Para ello se realizó una tercera matriz de datos utilizando una extensión del programa R denominada ‘Polysat’ (Clark y Jasieniuk, 2011), la que pudo leer la matriz de Structure y la convirtió a una matriz de datos compatible con TETRASAT.

5. RESULTADOS

5.1 Análisis de diversidad fenotípica

Para determinar el grado de diversidad fenotípica de las líneas de selección avanzada de quínoa, se realizó un análisis de componentes principales. Para ello, se consideraron 10 réplicas por cada línea seleccionada y la evaluación de 14 caracteres mencionados en la sección de Materiales y Métodos. Los datos fueron tabulados y analizados a través de un análisis de componentes principales (Figura 1).

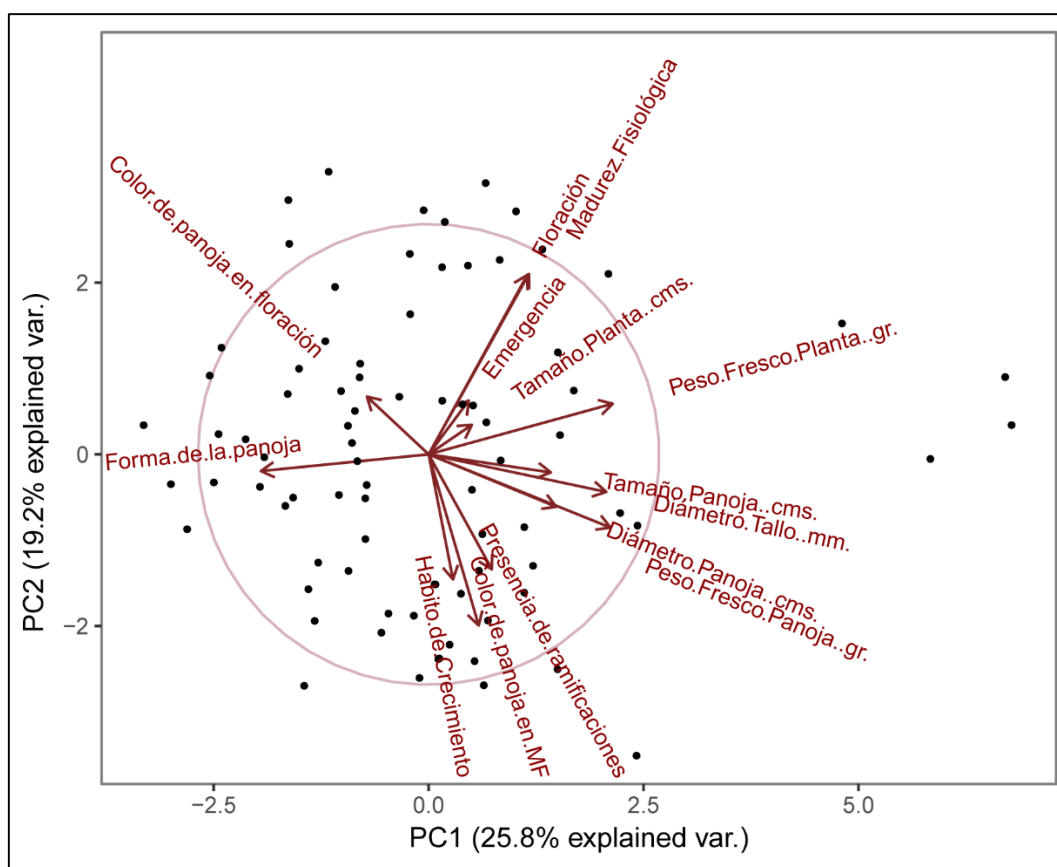


Figura 1. Análisis de componentes principales (PCA) de los caracteres de quínoa en las 96 líneas de selección avanzada. Cada eje representa el porcentaje de explicación de las variables resumidas en 2 componentes. Los puntos en negro representan a cada individuo o línea seleccionada del banco de germoplasma y los vectores en rojo representan los caracteres analizados.

En la Figura 1, se muestra el grado de diversidad de las líneas seleccionadas de acuerdo a los caracteres analizados. El componente principal 1 explica el 25,5% de la variabilidad mientras que el componente principal 2 explica un 19,2%. No se observan claramente grupos o “clusters” entre las selecciones. Los ángulos que forman los factores o vectores en el gráfico determinan qué caracteres están relacionados entre sí mayoritariamente con la diversidad de las líneas seleccionadas. Asimismo, los tamaños de los vectores son útiles para discriminar qué caracteres serían los más informativos al momento de analizar la diversidad presente en las líneas seleccionadas.

Considerando lo anterior, se puede observar que los caracteres que tienen mayor significancia en el PC1 corresponden a “Forma de la panoja”, “Peso fresco de la planta”, “Diámetro del tallo” y “Diámetro de la panoja” pues los vectores que forman en la gráfica obtenida son de tamaño más considerable que, por ejemplo, el “Tamaño de la planta”. Al analizar el segundo componente, se pudo observar que los caracteres con mayor significancia fueron “Floración”, “Color de la panoja en Madurez Fisiológica” y “Presencia de Ramificaciones”.

Con el objetivo de determinar la relación entre caracteres, se graficó la correlación de Pearson (Figura 2). En la Figura 2, se puede apreciar en cada eje los caracteres analizados y una escala logarítmica que contempla valores de -1 a 1.

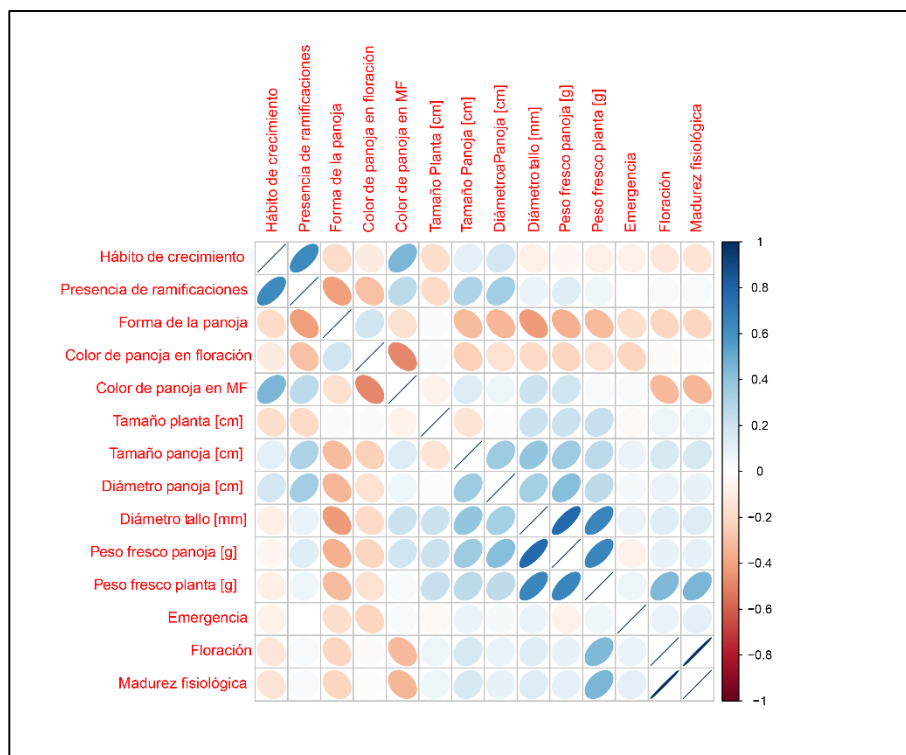


Figura 2. Análisis de correlación fenotípica de las líneas seleccionadas de quínoa. Representación gráfica de la relación que existe entre los caracteres. A la derecha de la Figura se muestra una escala logarítmica de correlación de Pearson, donde el color rojo (-1) es una correlación negativa y el color azul una correlación positiva (+1). El color blanco representa la no correlación entre las variables analizadas.

En la Figura 2, se observan las correlaciones según R de Pearson que existen entre los diferentes caracteres. Aquellas diagonales que se inclinan hacia la derecha muestran una correlación fenotípica directa. El aumento del grosor de las elipses indica que el grado de correlación entre estas variables se acerca cero, hasta llegar a las diagonales que se inclinan hacia la izquierda, que representan una correlación fenotípica inversa. De este modo, es posible observar que las variables de floración y madurez fisiológica son los caracteres que presentaron el valor de r más cercano a 1 en este estudio, mientras que el color de la panoja en madurez fisiológica y el color de la panoja en floración correspondieron a los caracteres con la correlación con valores cercanos a -1.

Tabla 2. Análisis de correlación entre los caracteres de quínoa analizados. En el área inferior a la diagonal de muestran los *p-value* obtenidos del análisis y en área superior a la diagonal se muestran los valores de R de Pearson.

	Hábito de Crecimiento	Presencia de Ramificaciones	Forma de la panoja	Color de la panoja en floración	Color de la panoja en MF	Tamaño de la planta	Tamaño de la panoja	Dímetro de la panoja	Dímetro del tallo	Peso fresco de la panoja	Peso fresco de la planta	Emergencia	Floración	Madurez fisiológica
Hábito de Crecimiento	*****	0,633	-0,186	-0,104	0,451	-0,172	0,118	0,190	-0,082	-0,046	-0,086	-0,079	-0,139	-0,145
Presencia de Ramificaciones	<0,001	*****	-0,416	-0,295	0,266	-0,195	0,308	0,346	0,083	0,135	0,066	0,004	0,039	0,037
Forma de la panoja	0,075	<0,001	*****	0,198	-0,163	0,027	-0,313	-0,336	-0,429	-0,356	-0,317	-0,176	-0,218	-0,219
Color de la panoja en floración	0,323	0,004	0,057	*****	-0,481	0,028	-0,236	-0,158	-0,196	-0,216	-0,158	-0,216	-0,029	-0,012
Color de la panoja en MF	<0,001	0,010	0,118	<0,001	*****	-0,069	0,144	0,062	0,215	0,196	0,038	0,036	-0,328	-0,333
Tamaño de la planta	0,099	0,061	0,799	0,792	0,511	*****	-0,144	0,011	0,210	0,220	0,220	-0,037	0,077	0,078
Tamaño de la panoja	0,262	0,003	0,002	0,023	0,170	0,170	*****	0,358	0,393	0,354	0,270	0,087	0,172	0,179
Dímetro de la panoja	0,069	0,001	0,001	0,132	0,522	0,913	<0,001	*****	0,337	0,429	0,251	0,043	0,082	0,091
Dímetro del tallo	0,437	0,430	<0,001	0,059	0,039	0,043	<0,001	0,001	*****	0,789	0,654	0,086	0,135	0,147
Peso fresco de la panoja	0,659	0,197	<0,001	0,038	0,060	0,034	<0,001	<0,001	<0,001	*****	0,658	-0,071	0,097	0,104
Peso fresco de la planta	0,412	0,529	0,002	0,130	0,720	0,034	0,009	0,015	<0,001	<0,001	*****	0,061	0,448	0,452
Emergencia	0,452	0,966	0,092	0,037	0,732	0,728	0,406	0,679	0,410	0,500	0,564	*****	0,086	0,113
Floración	0,183	0,710	0,035	0,786	0,001	0,463	0,100	0,399	0,196	0,356	<0,001	0,412	*****	0,995
Madurez fisiológica	0,165	0,726	0,035	0,911	0,001	0,460	0,086	0,385	0,158	0,320	<0,001	0,280	<0,001	*****

En la diagonal superior se observan los coeficientes R de Pearson. El signo de cada uno de estos valores representa si esta correlación es directa o indirectamente proporcional entre los caracteres analizados. De este modo, se pudo observar que los caracteres con la correlación más directa correspondieron a floración con madurez fisiológica con un valor de 0,995. Por otra parte, las diagonales inferiores representan el *p-value* que existió entre estas correlaciones. De este modo, al analizar la correlación entre maduración y madurez fisiológica se pudo observar que el *p-value* fue menor a 0,001 lo que indica que esta

correlación tuvo alta representatividad. De igual manera se observó la correlación directa entre diámetro del tallo con peso fresco de la panoja ($R= 0,789$) y una correlación indirecta entre color de la panoja en madurez fisiológica y color de la panoja en floración ($R= -0,481$), ambas correlaciones con un *p-value* menor a 0,001.

5.2 Extracción de DNA genómico y análisis de integridad

Se extrajo material genómico de las 96 líneas seleccionadas de quínoa. La concentración promedio de éstas fue de 88,85 ng/ μ L siendo 33,07 ng/ μ L la muestra con menor concentración y 186,16 ng/ μ L la muestra con la más alta concentración. El DNA extraído no presentó degradación (Figura 3) por lo que, tanto la concentración como la integridad, fueron suficientes para llevar a cabo las reacciones de PCR con los microsatélites.

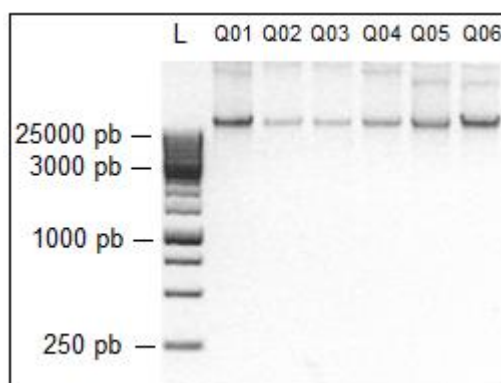


Figura 3. Gel de integridad del DNA. Gel de agarosa al 1,5 % (p/v) para 6 muestras de DNA genómico de individuos seleccionados de quínoa a una concentración de 20 ng/ μ L. Muestras extraídas con el protocolo modificado del DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN).

5.3 Selección de marcadores SSR para genotipificación de líneas seleccionadas de quínoa

A partir de bibliografía existente se seleccionaron 24 microsatélites. Éstos se agruparon de acuerdo a dos parámetros. El primero consistió en seleccionar marcadores que

tuviesen un comportamiento pseudo-diploide en quínoa para así testear dentro de las líneas de selección avanzada de este estudio el tipo de producto de PCR obtenido. El segundo criterio fue seleccionar marcadores que tuviesen un alto índice de polimorfismo en quínoa para así lograr identificar diferencias en aquellos individuos que, por ser de un mismo ecotipo, presentaran menos diferencias.

En base al primer criterio de selección se genotipificaron los individuos de las líneas seleccionadas en geles de agarosa para ver la especificidad de estos marcadores. En la Figura 4 se muestran cuatro individuos genotipificados con 6 SSR pseudo-diploides.

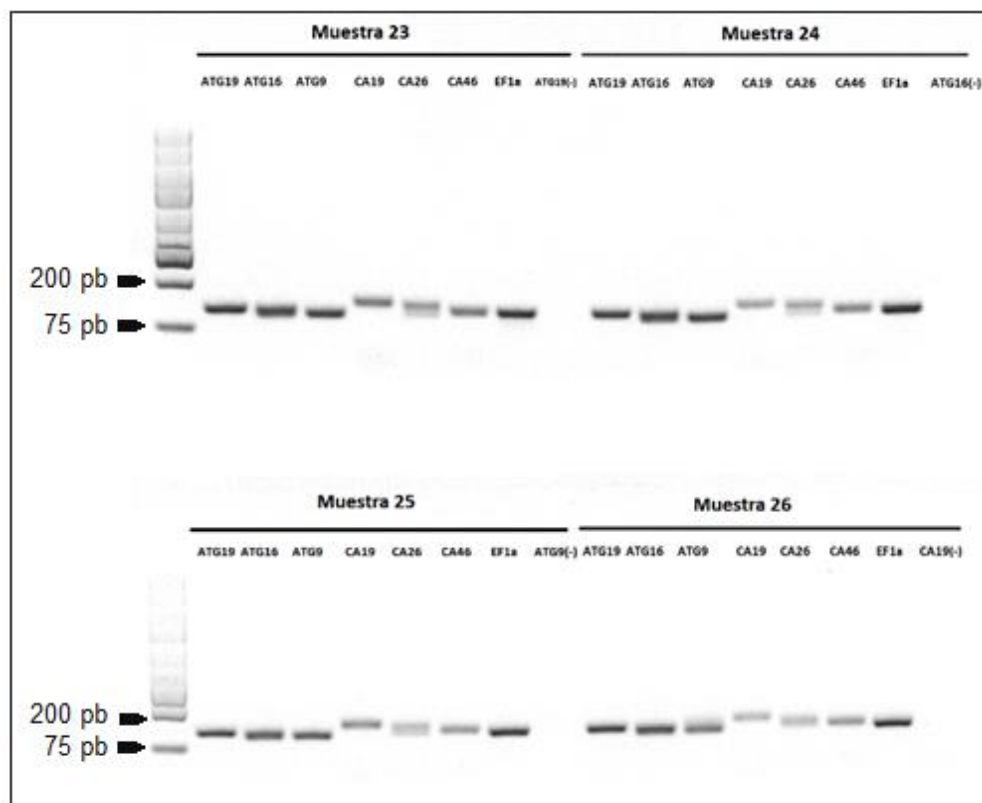


Figura 4. Genotipificación de líneas seleccionadas de quínoa. Gel de agarosa al 2,0 % (p/v) para los productos de PCR de 6 SSR en las líneas 23, 24, 25 y 26. Se usó como control positivo EF1 α y como estándar de peso GeneRuler™ 1Kb plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Mediante electroforesis en gel de agarosa se observó que el tamaño de los productos de PCR obtenidos con los SSR pseudo-diploides para quínoa tuvieron un tamaño que fluctuó entre las 75 y 200 pb respecto al estándar de migración utilizado. Además de esto se corroboró que éstos no tuviesen más de 2 productos de PCR. Si bien en la mayoría de los SSR que se muestran en la Figura 4 los productos de PCR presentaron un amplicón similar entre las muestras analizadas, se pudo observar que el SSR QCA26 en 3 de las 4 muestras analizadas hubo 2 productos de PCR mientras que en la muestra 26 se vio un producto único.

Posteriormente, se continuó con la genotipificación de la totalidad de los microsatélites mediante electroforesis capilar. En la Figura 5 se muestra la genotipificación del marcador KCAA011 específico de quínoa. Para este marcador se obtuvieron 10 alelos con un rango de 220 a 253 pb. Los individuos heterocigotos para este marcador lo fueron sólo para 2 alelos.

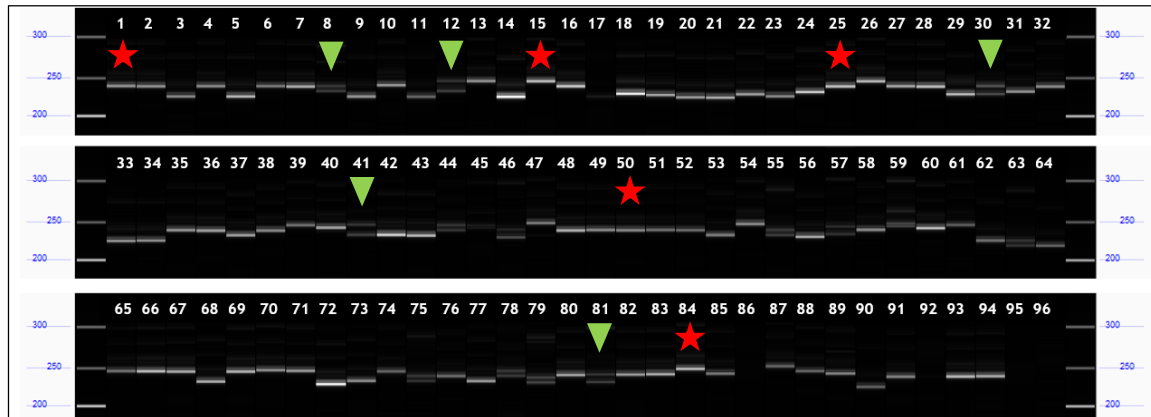


Figura 5. Genotipificación de la población de líneas seleccionadas de quínoa. Genotipificación de 96 individuos presentes en la población con el marcador KCAA011 mediante electroforesis capilar (Fragment Analyzer™ Automated CE System) representada en un gel virtual arrojado por el programa ProSize 2.0. En los extremos de la figura se muestra el estándar de migración y el tamaño de éste. Los números en blanco indican cada individuo de quínoa. Las estrellas en color rojo representan algunos de los individuos homocigotos para este marcador, mientras que los triángulos verdes representan algunos de los genotipos heterocigotos éste.

5.4 Estimación de la diversidad genética y estructura poblacional en líneas seleccionadas de quínoa

Se analizaron los datos obtenidos de la totalidad de SSR mediante la generación de una matriz. A partir de ésta se obtuvieron los estadísticos para medir la diversidad genética presente en 96 líneas seleccionadas del banco de germoplasma de quínoa. En la Tabla 3 se muestran los datos de cada SSR.

Tabla 3. Microsatélites utilizados para la genotipificación de 96 líneas seleccionadas del banco de germoplasma de quínoa. Resultados de la genotipificación de la población de individuos de quínoa usando 24 microsatélites. En la Tabla se observan el locus, motivo de repetición, tamaño alélico (pb), alelos observados (N), alelos efectivos (N_a), Heterocigosidad (H_o , H_e) y PIC.

Locus	Motivo de repetición	Tamaño alélico (pb)	Alelos observados (N)				Alelos efectivos (N_a)			Heterocigosidad (H_o)			Heterocigosidad (H_e)			PIC*		
			Total	Salares	Costa	Compartidos	Total	Salares	Costa	Total	Salares	Costa	Total	Salares	Costa	Total	Salares	Costa
QATG12	(ATC)8	165-175	2	0	1	1	1,17	1,00	1,03	0,01	0,00	0,01	0,14	0,00	0,03	0,13	0,00	0,03
QATG19	(ATC)12	160-260	4	0	0	4	1,12	4,00	1,02	0,07	1,00	0,01	0,11	0,75	0,02	0,10	0,70	0,02
QATG9	(GAT)5	143-226	2	0	0	2	1,31	2,00	1,25	0,27	1,00	0,21	0,23	0,50	0,20	0,21	0,38	0,18
QCA19	(CA)10	182-188	2	0	1	1	1,16	1,00	1,02	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,02	0,13	0,00	0,02
QCA2	(CA)20	149-160	4	0	2	2	2,87	2,00	2,88	0,94	1,00	0,88	0,65	0,50	0,65	0,59	0,38	0,59
QCA26	(TG)12	145-181	3	0	2	1	2,24	1,00	2,30	0,91	0,00	0,91	0,45	0,00	0,57	0,38	0,00	0,47
QCA28	(CA)10	139-145	2	0	1	1	1,18	1,00	1,05	0,02	0,00	0,02	0,15	0,00	0,04	0,14	0,00	0,04
QCA37	(CA)17	180-265	8	0	4	4	4,72	3,79	4,62	1,00	1,00	1,00	0,79	0,74	0,78	0,76	0,69	0,75
QCA46	(CA)18	150-155	2	0	1	1	1,16	1,00	1,02	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,02	0,13	0,00	0,02
QCA48	(CA)13	231-243	3	0	2	1	1,52	1,00	1,36	0,18	0,00	0,18	0,34	0,00	0,27	0,30	0,00	0,25
QCA5	(CA)16	174-189	4	0	2	2	1,70	1,38	1,49	0,09	0,33	0,08	0,41	0,28	0,33	0,37	0,24	0,28
QCA57	(CA)22	160-183	4	1	2	1	1,68	1,80	1,51	0,09	0,00	0,09	0,41	0,44	0,34	0,37	0,35	0,31
QCA58	(TG)16	167-194	4	1	3	0	2,35	1,00	2,08	0,04	0,00	0,04	0,57	0,00	0,52	0,48	0,00	0,41
QCA63	(CA)11	169-188	3	0	1	2	1,10	1,38	1,08	0,03	0,00	0,03	0,09	0,28	0,07	0,09	0,24	0,07
QCA65	(CA)19	162-284	4	0	3	1	1,12	2,37	1,06	0,03	0,33	0,01	0,11	0,58	0,05	0,11	0,49	0,05
QCA66	(CA)32	165-189	4	0	1	3	3,22	1,68	2,97	0,04	0,17	0,03	0,69	0,40	0,66	0,63	0,35	0,59
KAAT037	(TAA)19	232-359	15	2	12	1	6,18	2,72	5,57	0,08	0,00	0,08	0,84	0,56	0,82	0,83	0,50	0,80
KAAT041	(ATT)13AG(TAT)4TAG(TAT)5TG(TTA)5	125-265	9	5	2	2	1,13	5,39	1,02	0,07	1,00	0,01	0,11	0,81	0,02	0,11	0,79	0,02
KCAA006	(CAA)5	152-184	7	0	3	4	3,70	3,57	3,47	0,97	1,00	0,91	0,73	0,72	0,71	0,69	0,66	0,67
KCAA011	(ATT)10(GTT)7GTA(GTT)15	220-253	10	0	9	1	5,40	1,00	5,13	0,13	0,00	0,13	0,81	0,00	0,80	0,79	0,00	0,78
KCAA022	(GTT)12	149-164	6	2	4	0	4,16	1,60	3,70	0,11	0,17	0,11	0,76	0,38	0,73	0,72	0,30	0,68
KCAA091	(GTT)5(ATT)4	182-207	5	0	4	1	1,73	1,00	1,53	0,02	0,00	0,02	0,42	0,00	0,35	0,40	0,00	0,32
KCAA095	(GTTGGT)2(GTT)2	248-275	4	0	3	1	2,53	1,00	2,25	0,05	0,00	0,05	0,61	0,00	0,56	0,56	0,00	0,50
KGA165	(TG)19(AG)19	145-153	3	0	1	2	2,61	1,80	2,54	0,67	0,67	0,67	0,62	0,44	0,61	0,55	0,35	0,53
Total			114	11	64	39	57,06	45,48	52,95									
Promedio			4,75	0,46	2,67	1,63	2,38	1,90	2,21	0,24	0,32	0,23	0,43	0,31	0,38	0,40	0,27	0,35

* Polymorphic Information Content

En la Tabla 3, se resumen los alelos obtenidos y observados separados de acuerdo con la localidad geográfica de los individuos de quínoa. Además, se muestran los índices de heterocigosidad separados bajo el mismo rigor mencionado y el valor de PIC.

Se observó que el tamaño de los alelos para los SSR de quínoa fue entre 125 y 359 pb. En promedio se obtuvieron 4,75 alelos en las líneas seleccionadas de quínoa, con un mínimo de 2 en casi la totalidad de los SSR pseudo-diploides y un máximo de 15 alelos obtenidos con el SSR KAAT037. Se obtuvo una heterocigosidad promedio de 0,24 siendo el SSR más heterocigoto en las líneas de selección el KCAA066 con un valor de 0,97. El PIC en las selecciones de quínoa fluctuó entre 0,02 y 0,82 arrojando un promedio de 0,4.

Los mismos datos utilizados para la generación de la primera matriz se usaron para generar un dendrograma. La Figura 6 muestra una representación de qué tan diversas fueron las líneas seleccionadas de quínoa. A la izquierda de esta imagen se observan 6 barras verticales que corresponden a los análisis de estructura poblacional bajo diferentes criterios de diferenciación de las posibles subpoblaciones presentes en las líneas seleccionadas ($k = 2$ a $k = 8$). Dentro de cada una de estas columnas se observan barras horizontales que representan a cada genotipo incluido en este trabajo. Los diferentes colores que se aprecian corresponden a la introgresión genética que posee cada individuo bajo los diferentes parámetros de análisis. A la derecha de esta imagen se observa el dendrograma generado utilizando como distancia genética la distancia Euclídea. Se ve en este dendrograma que la distancia genética es aproximadamente 12 y que las líneas seleccionadas de quínoa se agrupan en 2 grupos principales, que correspondieron a los genotipos del ecotipo Salares y ecotipo Costero o Tierras bajas (“Lowlands”).

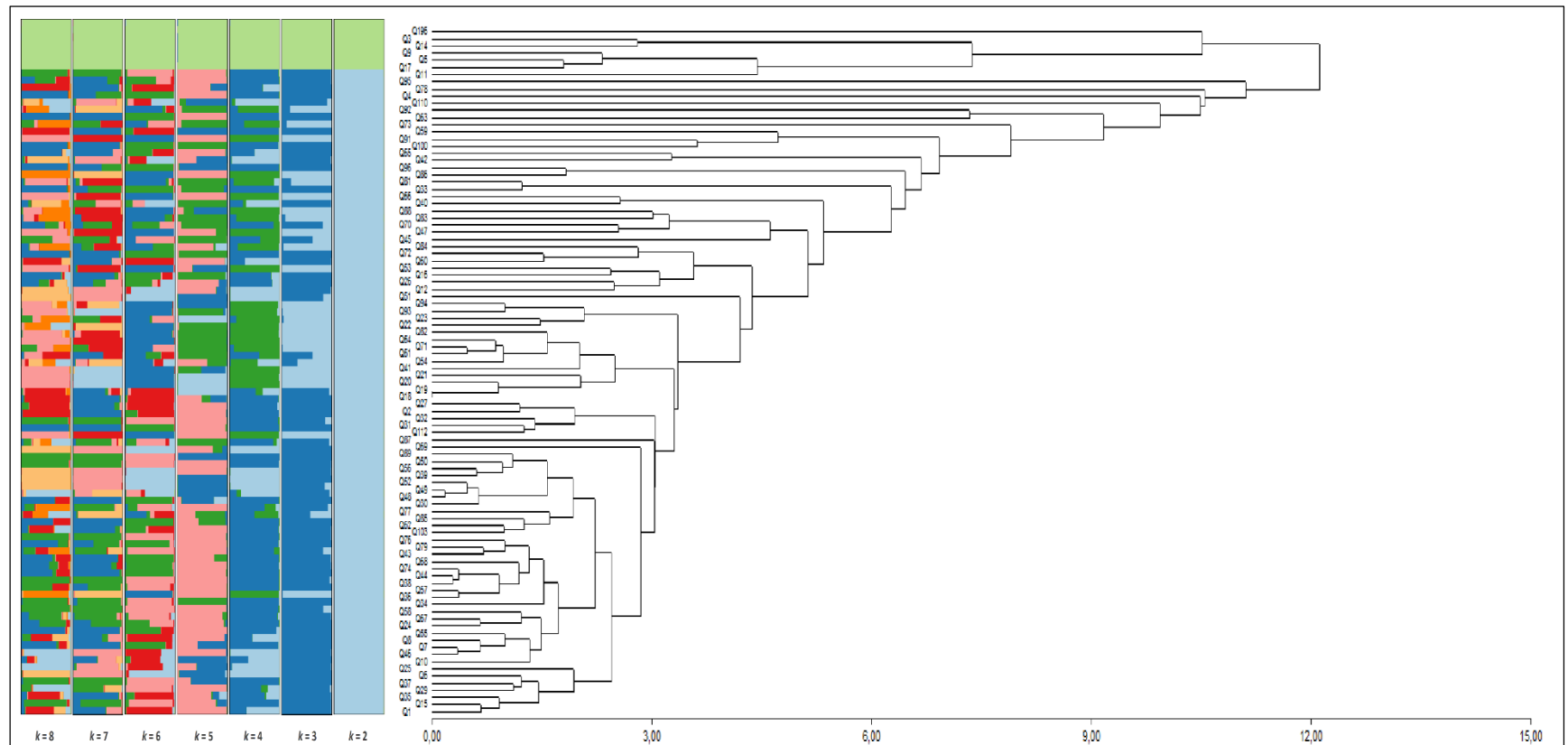


Figura 6. Estimación de diversidad genética de las líneas seleccionadas de quínoa. En el lado izquierdo de la figura se muestra la estructura poblacional usando valores de k de 2 a 8. Cada barra horizontal representa el “background” genético de cada individuo de quínoa. A la derecha de la figura se muestra el dendrograma generado con la totalidad de los individuos analizados en este trabajo.

Finalmente, se determinó la estructura poblacional presente en el banco de germoplasma. Como lo muestra la Figura 7, se obtuvieron 3 subpoblaciones de quínoa. Dos de los grupos correspondieron a los ecotipos descritos de quínoa que son Costero o Tierras bajas y Salares. Se obtuvo un tercer grupo de individuos correspondientes al ecotipo Costero o Tierras bajas, provenientes del Centro-Sur de Chile.

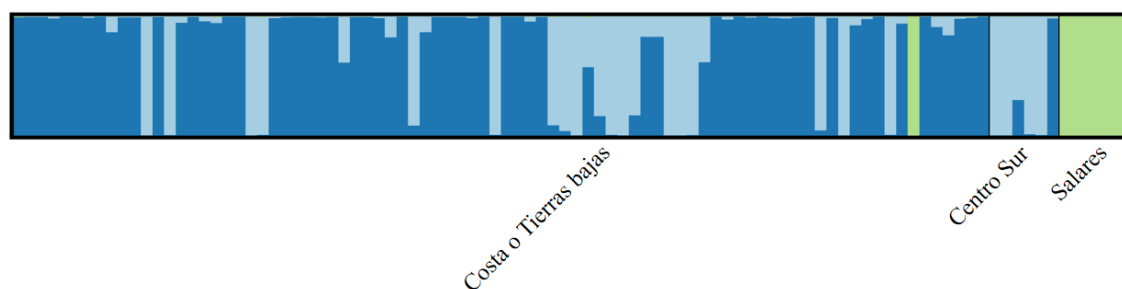


Figura 7. Estimación de la estructura poblacional en las líneas seleccionadas de quínoa. Representación gráfica de la estructura poblacional presente en el banco de germoplasma de quínoa. Cada barra vertical representa a un individuo dentro de la población, así como cada color representa el “background” genético de cada uno de estos individuos.

Adicionalmente se hizo una representación geográfica de la estructura poblacional obtenida con la localidad donde fueron colectadas las líneas de selección avanzada de quínoa. En la Figura 8 se pueden observar las 3 subpoblaciones obtenidas y las zonas geográficas donde se colectaron las líneas de selección avanzada de quínoa respectivamente. Se destaca en rojo la presencia del ecotipo Centro Sur, correspondiente a líneas de selección avanzada colectadas en La Araucanía.

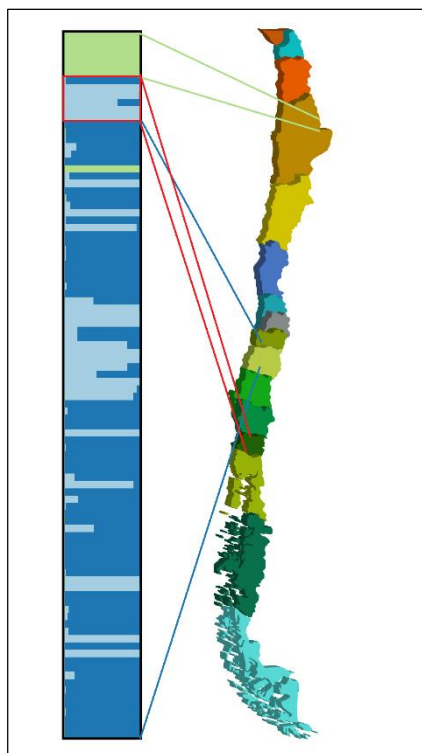


Figura 8. Representación de estructura poblacional obtenida en el territorio de colección de las líneas seleccionadas. Al lado izquierdo se muestra la estructura poblacional y al lado derecho se muestra un mapa de Chile. El color verde representa las líneas seleccionadas de quínoa colectadas en la Región de Tarapacá, correspondiente al ecotipo Salares. El color azul representa las líneas seleccionadas colectadas entre las regiones de O'Higgins y Maule, correspondiente al ecotipo Costa o Tierras bajas. El color rojo representa las líneas seleccionadas colectadas en la región de La Araucanía correspondientes al ecotipo Centro Sur.

6. DISCUSIÓN

6.1 Análisis de diversidad fenotípica

La quínoa es un pseudocereal que se ha cultivado a lo largo de Sudamérica durante aproximadamente 7000 años. Existen diferencias climáticas muy contrastantes entre los países donde se cultiva esta especie. Sin embargo, la quínoa se ha adaptado a estas diferencias a lo largo del tiempo. Es así como existen variedades de quínoa que tienen diferentes fenotipos de acuerdo con el clima, depredadores y enfermedades que pudiesen enfrentar (Jacobsen *et al.*, 2003).

Se ha visto, que existe gran diversidad morfológica en plantas de quínoa del territorio chileno. Los pueblos precolombinos, como los Aymara y Mapuche, que cultivaron esta semilla pudieron haber sido un factor importante en dicha diversidad. La comercialización y migración de estos pueblos, así como la selección tanto natural como artificial fueron claves en la diversificación de este cultivo a lo largo y ancho de Chile (Fuentes *et al.*, 2009).

Se ha reportado que las plantas de quínoa que crecen en el altiplano contienen una mayor cantidad de saponinas que aquellas que se cultivan en tierras bajas o a nivel del mar. Esto podría estar relacionado con los nutrientes presentes en el suelo y la salinidad de ésta, así como los depredadores que pudiesen estar presentes en estas zonas (Pulvento *et al.*, 2012). Se ha reportado que el contenido de estos compuestos tendría un rol relevante en los mecanismos de defensa de la quínoa, pues se ha reportado que el contenido de este glicósido podría estar implicado en la resistencia de esta planta a hongos patógenos (Stuardo y San Martín, 2008).

De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo determinar que existe un alto nivel de diversidad fenotípica dentro de las 96 líneas seleccionadas por el PMG-Quínoa, provenientes del banco de germoplasma de quínoa. El PCA obtenido mostró un porcentaje de explicación de un 49 % para el PC1 y el PC2. Considerando trabajos previamente realizados (Ortiz *et al.*, 1998; Curti *et al.*, 2012), donde se analizaron descriptores morfológicos, los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes con estas publicaciones. Concordante con lo

expuesto, cabe señalar que tanto las líneas seleccionadas en este trabajo como los materiales de quínoa analizadas en el trabajo de Curti *et al.* (2012) mostraron resultados similares en los caracteres estudiados. Esto podría deberse a que el material vegetal del territorio argentino es resultado de la introducción de quínoa del altiplano boliviano y chileno, por lo que existiría una gran similitud entre éstas y las líneas de selección estudiadas en este trabajo.

Las correlaciones existentes entre los caracteres analizados en este trabajo también son concordantes con lo que se ha descrito en De Santis *et al.* (2016). En este trabajo se determinó que aquellos caracteres con una correlación más directa fueron la presencia de ramificaciones con hábito de crecimiento, peso fresco de la panoja con diámetro del tallo, peso fresco de la panoja con peso fresco de la planta y peso fresco de la planta con diámetro del tallo. Estos resultados coinciden con lo esperado respecto al comportamiento de la planta, puesto que la cantidad de ramificaciones será mayor si el hábito de crecimiento de la planta es ramificado. Lo mismo se esperaría con respecto al peso fresco tanto de la planta como de la panoja respecto al diámetro del tallo, pues si las panojas tienen una mayor masa el tallo de la planta se ve forzado a soportar este peso. La evidencia sugiere que existe una correlación directa entre el diámetro del tallo en quínoa y la altura de la planta, el ancho de la hoja con la longitud de la misma, una alta correlación entre el tiempo que se demora en brotar y el tiempo que transcurre hasta que florece la planta (Curti *et al.*, 2012; De Santis *et al.*, 2016).

Considerando factores abióticos y efectos mayores dados por el cambio climático, la quínoa surge como una potencial alternativa de alimentación debido a las características previamente mencionadas. Los estudios morfológicos y fenotípicos de este cultivo cobran relevancia debido a que el cultivo es capaz de crecer en una multiplicidad de ambientes. Sin embargo, se ha descrito que, aunque posee grandes ventajas adaptativas, es altamente sensible al fotoperiodo (Christiansen *et al.*, 2010).

Al observar los diferentes ecotipos existentes de quínoa y las condiciones ambientales donde éstos se desarrollan, se puede observar que el ecotipo Costero o tierras bajas que se utiliza principalmente en Chile adquiere un papel fundamental en esta problemática. Esto se debe a que en Chile tanto las condiciones climáticas como de fotoperiodo se asemejan más a los países europeos y asiáticos que han intentado cultivar quínoa, como Dinamarca, España, Israel e India por mencionar algunos (Bhargava *et al.*, 2007).

6.2 Diversidad genética presente en líneas seleccionadas del germoplasma de quínoa.

Los parámetros utilizados para medir la diversidad genotípica presente en las líneas seleccionadas son los que se encuentran resumidos en la Tabla 3. Con éstos se estimó qué tan polimórficos fueron los SSR en esta población de estudio y si estos resultados fueron replicados respecto a las referencias en las que fueron descritos.

Se obtuvo un total de 114 alelos dentro de la población en un rango entre 2 y 15 con un promedio de 4,75 alelos por locus. Se pudo observar que utilizando los SSR con comportamiento pseudo-diploide publicados por Maughan *et al.* (2004) obtuvimos resultados similares en un 75 % de éstos. Dado el objetivo de la publicación mencionada no existe más información respecto a estos SSR. Al ser utilizados para la generación del primer mapa de ligamiento (Maughan *et al.*, 2012), la información disponible es el tamaño de los productos de PCR. En el 25% de estos marcadores (4 SSR, QATG12, QCA26, QCA28 y QCA46) donde los productos de PCR no coincidieron con lo publicado, los productos de PCR variaron en aproximadamente 10 pb respecto a la referencia. Esta variación se explicaría por el método de genotipificación utilizada tanto en la publicación referida como en este trabajo. Es posible que la genotipificación en geles de agarosa al 3 %p/v versus Electroforesis Capilar, generen diferencias en los resultados debido a la resolución máxima de cada método.

Por otra parte, los SSR publicados por Jarvis *et al.* (2008) poseen más información pues el objetivo de ésta fue desarrollar nuevos SSR polimórficos. De este modo, de los 216 nuevos SSR se seleccionaron 8 que tuviesen una alta heterocigosidad ($H > 0,70$). Los resultados obtenidos en este trabajo fueron consistentes con los publicados. Sin embargo, existen variaciones respecto al número de alelos observados. Hubo diferencias de 1 alelo observado en 6 de los 8 SSR respecto a lo publicado y una diferencia de 2 alelos en uno de éstos (KAAT037). Si bien en uno de los marcadores utilizados (KCAA095) se obtuvieron 4 alelos al igual que lo reportado, éstos tuvieron un tamaño diferente a la referencia. Lo que se obtuvo en la genotipificación de este marcador fueron 4 alelos con un tamaño de 248, 268, 271 y 275 pb, respectivamente, mientras que la publicación reporta un tamaño esperado de 150 pb. Las diferencias obtenidas en este trabajo también se relacionan con el método de genotipificación, pues al igual que en el caso anterior, éstos se genotipificaron en una matriz de agarosa al 3 %p/v. Asimismo, el número de individuos analizados tendría un rol

importante en estas diferencias. En la publicación reportada se usaron 23 individuos de los cuales 4 corresponden al ecotipo Costero de plantas chilenas obtenidas de bancos de germoplasma europeos y 3 corresponden a quínoa ecotipo Salares, es decir los 2 ecotipos que se producen en Chile. Si éstas se comparan con las 96 líneas seleccionadas que se utilizaron en este trabajo, 90 de éstas corresponden a ecotipo Costero y 6 a ecotipo Salares, por lo que se podría esperar algún grado de variación en la genotipificación tal como se vio en los resultados.

Para determinar qué tan diversa es efectivamente una población en estudio es necesario enfocarse en el valor de heterocigosidad esperada y observada. Dependiendo del tipo de marcador que se use, se espera que exista una heterocigosidad con un alto valor para poder así tener una variabilidad suficiente para poder llevar a cabo futuros programas de mejora o para evitar monocultivos (Miranda *et al.*, 2013). Los microsatélites tienen naturaleza multialélica, por lo tanto, se espera que dentro de la población de estudio exista un alto índice de heterocigosidad.

Trabajos realizados con anterioridad muestran que la quínoa posee un alto índice de diversidad genética. Costa Tártara *et al.* (2012), usando microsatélites, demostró con 35 accesiones de quínoa de Argentina, la alta diversidad de la especie entre localidades.

Al analizar los resultados obtenidos se pudo observar que en promedio la heterocigosidad fue de 0,24 mientras que lo esperado era de 0,43. Los valores obtenidos estuvieron en un rango de 0 a 1,0 mientras que respecto a la heterocigosidad esperada este rango fue de 0,09 a 0,84. De acuerdo a los antecedentes que se tienen respecto al uso de SSR en quínoa, estos valores son bajos en comparación a otras poblaciones de estudio (Christensen *et al.*, 2012; Costa Tártara *et al.*, 2012; Jarvis *et al.*, 2008; Zurita-Silva *et al.*, 2014). Una de las posibles explicaciones para este resultado tendría que ver con la naturaleza de las muestras analizadas. Las líneas seleccionadas utilizadas en este trabajo corresponden a muestras colectadas dentro de Chile y no se analizaron variedades, ni de quínoa ni de otra especie del mismo género *Chenopodium* como sí se hizo en la mayoría de estos trabajos. Otra explicación a este resultado se podría deber al tipo de SSR utilizados. Se debe tener en consideración que 16 de los 24 microsatélites son de naturaleza bi-alélica por lo que se

observa menor cantidad de polimorfismos en estos respecto de los 6 microsatélites más polimórficos.

En relación a los valores de PIC obtenidos se observó un rango entre 0,09 y 0,83 con un promedio de 0,40. De acuerdo a la definición de Botstein *et al.* (1980) un marcador será altamente informativo para un locus si el valor de PIC es superior a 5,0, relativamente informativo si este valor se encuentra entre 0,25 y 5,0 y ligeramente informativo si este valor es menor a 0,25. Se espera que en un estudio de poblaciones se encuentren loci con múltiples alelos y con un valor cercano a 1. En este contexto se obtuvieron 7 SSR que cumplieren con este criterio (QCA2, QCA37, QCA66, KAAT037, KCAA006, KCAA011 y KCAA022) de los cuales 3 son los que tienen el valor de PIC más alto y con mayor número de alelos por locus (KAAT037, KCAA011 y KCAA022). En resumen y considerando el valor promedio de PIC obtenido en este estudio se puede concluir que estos marcadores en su conjunto fueron relativamente informativos en cuanto a la diversidad genética presente en las líneas seleccionadas de quínoa.

Tomando en cuenta cada ecotipo por separado y considerando los parámetros de diversidad genética ya mencionados, se pudo observar que las líneas seleccionadas del ecotipo Costero presentaron un mayor número de alelos y un mayor valor de PIC promedio. Sin embargo, este mismo ecotipo tuvo menor heterocigosidad promedio que las muestras del ecotipo Salares, por lo que este último tendría una mayor variabilidad genética. Una de las hipótesis que se generan respecto a este resultado es que los individuos pertenecientes a este ecotipo se encuentran geográficamente más cercanos al centro de origen de la quínoa y, por ende, al centro de diversidad de este cultivo.

6.3 Estructura poblacional de las líneas seleccionadas de quínoa

La estructura poblacional tiene como objetivo determinar en qué grado está fragmentada la población en estudio. En base a esto, se han realizado análisis de estructura poblacional en cultivos de interés comercial como es duraznero (Aranzana *et al.*, 2010), maíz

(Bedoya *et al.*, 2017), papa (Juyó, 2015), pimienta (Álvarez-Carvalho *et al.*, 2016) y cacao (Bidot Martínez *et al.*, 2014).

Durante la última década se han llevado a cabo este tipo de análisis en especies como la quínoa. Fuentes *et al.* (2009) observó en su trabajo que en plantas de quínoas colectadas en territorio chileno hubo, además de una alta variabilidad genética, un número de subpoblaciones igual a 3. Considerando que en Chile sólo se dan 2 de los 5 ecotipos de quínoa, el resultado de este estudio indicó que habría un tercer putativo ecotipo de quínoa correspondiente a aquellas plantas que, si bien se dan a nivel del mar, crecen en latitudes mayores, por lo que debieron adaptarse a condiciones climáticas diferentes a las que se encuentran en la zona central de Chile.

Al analizar los datos obtenidos en este estudio mediante el software Structure, observamos que al igual que en la investigación de Fuentes *et al.* (2009), las líneas seleccionadas de quínoa del banco de germoplasma utilizadas estarían subdivididas en 3 subpoblaciones, corroborando así lo propuesto en la publicación mencionada. Sin embargo, al analizar nuevamente el dendrograma obtenido para determinar la diversidad genética de estas plantas, no podemos discriminar con absoluta claridad estas tres subpoblaciones. Esto podría deberse al manejo que han tenido estas plantas por parte de los agricultores, que las han ido seleccionando de acuerdo a sus ventajas adaptativas y agronómicas.

Al observar la Figura 7, podemos ver que tanto los genotipos del ecotipo Costero como Costero Centro-Sur tienen bastantes similitudes a nivel de introgresiones desde los “background” genéticos identificados. Sin embargo, al observar los genotipos del ecotipo Salares podemos ver que éstos fueron totalmente diferentes al resto de los individuos. Aun así, es extraño que uno de los individuos pertenecientes al ecotipo Costero presente un genotipo más bien similar a Salares. Esto nos hace presumir que hubo un error en la rotulación de este material o que éste a pesar de su genotipo se pudo desarrollar en este tipo de ambiente.

7. CONCLUSIONES

Mediante el análisis multivariado se pudo determinar que los caracteres de Diámetro de la panoja, Peso fresco de la panoja, Forma de la panoja, Floración y Color de la panoja en madurez fisiológica serían los mínimos para poder diferenciar fenotípicamente una población de quínoa colectada en territorio chileno.

Los caracteres de Floración y Madurez fisiológica fueron los que tuvieron una correlación más directa en la población analizada, mientras que Color de la panoja en madurez fisiológica y color de la panoja en floración fueron los caracteres con una correlación fenotípica más indirecta.

No es posible agrupar las Líneas de Selección Avanzada considerando los parámetros fenotípicos evaluados en las 96 líneas de selección avanzada de quínoa utilizando un análisis multivariado.

De acuerdo a los parámetros de diversidad genética como la heterocigosidad (0,24), número de alelos (14 alelos observados) y valor de PIC (0,40), se observó una diversidad genética media-alta entre las 96 accesiones.

Considerando los parámetros de Heterocigosidad ($>0,5$) y PIC ($>0,50$) se puede aseverar que, para estudios similares, se pueden analizar como mínimo 3 SSR correspondientes a QCA37, KAAT037 y KAAT041.

Las Líneas de Selección Avanzada de quinoa del banco de germoplasma del programa de INIA, se dividen en 3 subpoblaciones, corroborando la presencia de un putativo ecotipo Costero diferenciado exclusivo del centro-Sur de Chile, previamente reportado.

8. REFERENCIAS

Alfaro C., Zurita-Silva A., Castillo D., León-Lobos P., Seguel I., Díaz J., Ruf K., Pinto M., Matus I. (2015). Programa de Mejoramiento Genético en quínoa, la nueva apuesta de INIA. *Tierra Adentro*, 108: 39-41.

Álvares-Carvalho S. V., Duarte J. F., Santos T. C., Santos R. M., Silva-Mann R., Carvalho, D. (2016). Structure and genetic diversity of natural Brazilian pepper populations (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Genetics and Molecular Research* 15: 1-13.

Aranzana M. J., Abbassi E., Howad W., Arús P. (2010). Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. *BMC genetics* 11: 69.

Bazile D., Jacobsen S. E., Verniau A. (2016). The global expansion of quinoa: trends and limits. *Frontiers in Plant Science*, 7: 622.

Bazile D., Martínez E. A., Fuentes F. (2014). Diversity of Quinoa in a Biogeographical Island: a Review of Constraints and Potential from Arid to Temperate Regions of Chile. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 42: 289–298.

Bedoya C. A., Dreisigacker S., Hearne S., Franco J., Mir C., Prasanna B. M., Taba S., Charcosset A., Warburton M. L. (2017). Genetic diversity and population structure of native maize populations in Latin America and the Caribbean. *PloS one* 12(4): 1-21.

Bendevis M. A., Sun Y., Shabala S., Rosenqvist E., Liu F., Jacobsen S. E. (2013). Differentiation of Photoperiod-Induced ABA and Soluble Sugar Responses of Two Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Cultivars. *Journal of Plant Growth Regulation* 33: 562–570.

Bhargava A., Shukla S., Ohri D. (2007). Genetic variability and interrelationship among various morphological and quality traits in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Field Crops Research* 101: 104–116.

Bidot Martínez I., Riera Nelson M., Flamand M. C., Bertin P. (2014). Genetic diversity and

population structure of anciently introduced Cuban cacao *Theobroma cacao* plants. *Genetic Resources and Crop Evolution* 62: 67-84.

Bioversity International, FAO, PROINPA, INIAF y FIDA (2013). Descriptores para quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y sus parientes silvestres. Bioversity International, Roma, Italia; Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia; Fundación PROINPA, La Paz, Bolivia; Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal, La Paz, Bolivia; Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola, Roma, Italia.

Bonales-Alatorre E., Pottosin I., Shabala L., Chen Z. H., Zeng F., Jacobsen S. E., Shabala S. (2013). Differential activity of plasma and vacuolar membrane transporters contributes to genotypic differences in salinity tolerance in a halophyte species, *Chenopodium quinoa*. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 9267–9285.

Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics* 32(3): 314-331

Brown W. L. (1983). Genetic diversity and genetic vulnerability—an appraisal. *Economic botany* 37(1): 4-12.

Christensen S., Pratt D. B., Pratt C., Nelson P. T., Stevens M. R., Jellen E. N., Coleman C. E., Fairbanks D. J., Bonifacio A., Maughan P. J. (2007). Assessment of genetic diversity in the USDA and CIP-FAO international nursery collections of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) using microsatellite markers. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation* 5: 82–95.

Christiansen J., Jacobsen S. E., Jørgensen S. (2010). Photoperiodic effect on flowering and seed development in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science* 60: 539-544.

Clark L. V., Jasieniuk M. (2011). Polysat: An R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources* 11: 562–566.

Collard B. C. Y., Jahufer M. Z. Z., Brouwer J. B., Pang E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: *The basic concepts*. *Euphytica* 142: 169–196.

Costa Tártara S. M., Manifesto M. M., Bramardi S. J., Bertero H. D. (2012). Genetic structure in cultivated quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), a reflection of landscape structure in Northwest Argentina. *Conservation Genetics* 13: 1027–1038.

Curti R., Andrade A., Bramardi S., Velásquez B., Bertero D. (2012). Ecogeographic structure of phenotypic diversity in cultivated populations of quinoa from Northwest Argentina. *Annals of Applied Biology* 160: 114–125.

De Santis G., D'Ambrosio T., Rinaldi M., Rascio A. (2016). Heritabilities of morphological and quality traits and interrelationships with yield in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) genotypes in the Mediterranean environment. *Journal of Cereal Science* 70: 177–185.

Del Castillo C., Winkel T., Mahy G., Bizoux J. P. (2007). Genetic structure of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) from the Bolivian altiplano as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 897–905.

Di Rienzo J. A., Casanoves F., González L. A., Tablada E. M., Díaz M. D. P., Robledo C. W., Balzarini M. G. (2008). *Estadística para las ciencias agropecuarias* (No. 519.53 E79). UNED, San José (Costa Rica).

Dillehay T. D., Rossen J., Andres T. C., Williams D. E. (2007). Preceramic adoption of peanut, squash, and cotton in northern Peru. *Science* (New York, N.Y.) 316: 1890–1893.

Ellegren H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews. Genetics* 5: 435–445.

Fuentes F. F., Bazile D., Bhargava A., Martínez E. A. (2012). Implications of farmers' seed exchanges for on-farm conservation of quinoa, as revealed by its genetic diversity in Chile. *The Journal of Agricultural Science*, 1–15.

- Fuentes F. F., Jellen E. R., Maughan P. J. (2009). Diversidad Genética y Recursos Genéticos para el Mejoramiento de la Quinoa. *Revista Geográfica de Valparaíso* 42: 20-33.
- Gawlik-Dziki U., Świeca M., Sułkowski M., Dziki D., Baraniak B., Czyz J. (2013). Antioxidant and anticancer activities of *Chenopodium quinoa* leaves extracts - In vitro study. *Food and Chemical Toxicology* 57: 154–160.
- González J. A., Bruno M., Valoy M., Prado F. E. (2011). Genotypic Variation of Gas Exchange Parameters and Leaf Stable Carbon and Nitrogen Isotopes in Ten Quinoa Cultivars Grown under Drought. *Journal of Agronomy and Crop Science* 197: 81–93.
- Graf B. L., Poulev A., Kuhn P., Grace M. H., Lila M. A., Raskin I. (2014). Quinoa seeds leach phytoecdysteroids and other compounds with anti-diabetic properties. *Food Chemistry* 163. Elsevier Ltd: 178–185.
- Graf B. L., Rojas-Silva P., Rojo L. E., Delatorre-Herrera J., Baldeón M. E., Raskin I. (2015). Innovations in Health Value and Functional Food Development of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14: 431–445.
- Gupta P. K., Balyan H. S., Sharma P. C., Ramesh B. (1996). Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Current Science* 70: 45-54.
- Hartung F., Schiemann J. (2014). Precise plant breeding using new genome editing techniques: Opportunities, safety and regulation in the EU. *Plant Journal* 78: 742–752.
- Jacobsen S. E. (2003). Worldwide potential for Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Reviews International* 19: 167–177.
- Jacobsen S. E., Monteros C., Corcuera L. J., Bravo L. A., Christiansen J. L., Mujica A. (2007). Frost resistance mechanisms in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *European Journal of Agronomy* 26: 471–475.
- Jacobsen S. E., Mujica A., Ortiz R. (2003). La Importancia de los Cultivos Andinos 13: 13–24.

Jacobsen S. E., Mujica A., Jensen C. (2003). The resistance of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to adverse abiotic factors. *Food Reviews International* 19: 99-109.

Jarne P., Lagoda P. J. L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 424–429. Jarvis D. E., Kopp O. R., Jellen E. N., Mallory M. A., Pattee J., Bonifacio A., Coleman C. C., Stevens M. R., Fairbanks D. J., Maughan, P. J. (2008). Simple sequence repeat marker development and genetic mapping in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Genetics*, 87(1), 39-51.

Jarvis D. E., Ho Y. S., Lightfoot D. J., Schmöckel S. M., Li B, Borm T. J. A., Ohyanagi H., Mineta K., Michell C. T., Saber N., Kharbatia N. M., Rupper R. R., Sharp A. R., Dally N., Boughton B. A., Woo Y. H., Gao G., Schijlen E. G. W. M., Guo X., Momin A. A., Negrão S., Al-Babili S., Gehring C., Roessner U., Jung C., Murphy K., Arold S. T., Gojobori T., van der Linden C. G, van Loo E. N., Jellen E. N., Maughan P. J. and Tester M. (2017). The genome of *Chenopodium quinoa*. *Nature* 542: 307-326.

Jarvis D. E., Kopp O. R., Jellen E. N., Mallory M. A., Pattee J., Bonifacio A., Coleman C. E., Stevens M. R., Fairbanks D. J., Maughan, P. J. (2008). Simple sequence repeat marker development and genetic mapping in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Genetics*, 87(1), 39-51.

Jiang G. (2013). Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. *Plant Breeding from Laboratories to Fields*, 45–83.

Jimenez F. R., Maughan P. J., Alvarez A., Kietlinski K. D., Smith S. M., Pratt D. B., Elzinga D. B., Jellen E. N. (2013). Assessment of genetic diversity in Peruvian Amaranth (*Amaranthus caudatus* and *A. hybridus*) germplasm using single nucleotide polymorphism markers. *Crop Science* 53: 532–541.

Juyó D., Sarmiento F., Álvarez M., Brochero H., Gebhardt C., Mosquera T. (2015). Genetic diversity and population structure in diploid potatoes of Group Phureja. *Crop Science* 55(2): 760-769.

- Li X., Wei Y., Acharya A., Jiang Q., Kang J., Brummer E. C. (2014). A saturated genetic linkage map of autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) developed using genotyping-by-sequencing is highly syntenous with the *Medicago truncatula* genome. *G3: Genes/ Genomes/ Genetics* 4(10): 1971-1979.
- Loveless M., Hamrick J. (1984). Ecological Determinants of Genetic Structure in. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 65–95.
- Markwith S. H., Stewart D. J., Dyer J. L. (2006). TETRASAT: A program for the population analysis of allotetraploid microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 6: 586–589.
- Maughan P. J., Bonifacio A., Jellen E. N., Stevens M. R., Coleman C. E., Ricks M., Mason S. L., Jarvis D. E., Gardunia B. W., Fairbanks D. J. (2004). A genetic linkage map of quinoa (*Chenopodium quinoa*) based on AFLP, RAPD, and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1188–1195.
- Maughan P. J., Smith S. M., Rojas-Beltrán J., Elzinga D., Raney J., Jellen E. N., Bonifacio A., Udall J., Fairbanks D. J. (2012). Single Nucleotide Polymorphism Identification, Characterization, and Linkage Mapping in Quinoa. *The Plant Genome Journal* 5: 114.
- Mechoni A. (1747). Vida del venerable Padre Juan José Guillermo. Biblioteca Hispano Chilena. Tomo II, pág. 92.
- Miranda M., Vega-Gálvez A., Martínez E. A., López J., Marín R., Aranda M., Fuentes F. (2013). Influence of contrasting environments on seed composition of two quinoa genotypes: nutritional and functional properties. *Chilean Journal of Agricultural Research* 73(2): 108-116.
- Mujica A., Jacobsen S. E. (2006). La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y sus parientes silvestres. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 449–457.
- Oliveira E. J., Pádua J. G., Zucchi M. I., Vencovsky R., Vieira M. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294–307.

- Ortiz R., Ruiz-Tapia E., Mujica-Sanchez A. (1998). Sampling strategy for a core collection of Peruvian quinoa germplasm. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 475-483.
- Planella M. T., López M. L., Bruno M. C. (2013). La domesticación y distribución histórica. En: El estado del arte de la quinua en el 2013. Capítulo 1.3: 33-48.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Pritchard J. K., Wen X., Falush D. (2011). Documentation for structure software: Version 2.3. *Molecular Ecology Resources* 6: 321–359.
- Pulvento C., Riccardi M., Lavini A., Iafelice G., Marconi E., D'Andria R. (2012). Yield and Quality Characteristics of Quinoa Grown in Open Field Under Different Saline and Non-Saline Irrigation Regimes. *Journal of Agronomy and Crop Science* 198: 254–263.
- Rao R. V., Hodgkin T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 1–19.
- Rodríguez L., Isla M. T. (2009). Comparative analysis of genetic and morphologic diversity among quinoa accessions (*Chenopodium quinoa* Willd.) of the South of Chile and highland accessions. *Crop Science* 1: 210–216.
- Ruiz-Carrasco K., Antognoni F., Coulibaly A. K., Lizardi S., Covarrubias A., Martínez E., Molina-Montenegro M., Biondi S., Zurita-Silva A. (2011). Variation in salinity tolerance of four lowland genotypes of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as assessed by growth, physiological traits, and sodium transporter gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry* 49. Elsevier Masson SAS: 1333–1341.
- Smith, D. N., Devey, M. E. (1994). Occurrence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. *Genome* 37(6): 977-983.
- Stikic R., Glamoclija D., Demin M., Vucelic-Radovic B., Jovanovic Z., Milojkovic-Opsenica D., Jacobsen S. E., Milovanovic M. (2012). Agronomical and nutritional evaluation of quinoa

seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) as an ingredient in bread formulations. *Journal of Cereal Science* 55. Elsevier Ltd: 132–138.

Stuardo M., San Martín R. (2008). Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products* 27: 296–302.

Tang Y., Li X., Zhang B., Chen P. X., Liu R., Tsao R. (2015). Characterisation of phenolics, betanins and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd. genotypes. *Food Chemistry* 166. Elsevier Ltd: 380–388.

Tapia M. (2013). El largo camino de la Quinoa: ¿quiénes escribieron su historia?. Introducción general. En: Bazile *et al.* (ed), “*Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013*”: FAO (Santiago de Chile) y CIRAD, (Montpellier, Francia), Pp 3-10.

Team, R. (2014). RStudio: integrated development for R. *RStudio, Inc., Boston, MA*. URL <http://www.RStudio.com/ide>.

Tilman D., Knops J., Wedin D., Reich P., Ritchie M., Siemann E. (1997). The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science* 277: 1300–1302.

Tóth G., Gáspári Z., Jurka J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome research* 10: 967–981.

Towle M. (1961). The Ethnobotany of Pre-Columbian Peru. Viking Fund. Publication in Anthropology N 30, Wenner Green Foundation for Anthropological Research. Inc. New York. USA.

Vega-Gálvez A., Miranda M., Vergara J., Uribe E., Puente L., Martínez E. (2010). Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient Andean grain: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 2541–2547.

Von Baer I., Bazile D., Martinez E. (2009). Cuarenta años de mejoramiento de quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) en la Araucanía: Origen de “La Regalona-B”. *Revista Geográfica de Valparaíso* 42: 34–44.

Weber J. L. (1990). Informativeness of human (dC-dA)_n • (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* 7. 4: 524-530.

Zevallos V. F., Herencia L. I., Chang F., Donnelly S., Ellis J., Ciclitira P. J. (2014). Gastrointestinal effects of eating quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) in celiac patients. *The American Journal of Gastroenterology* 109. Nature Publishing Group: 270–278.

Zurita-Silva A., Fuentes F., Zamora P., Jacobsen S. E., Schwember A. R. (2014). Breeding quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): Potential and perspectives. *Molecular Breeding* 34: 13–30.

ANEXO

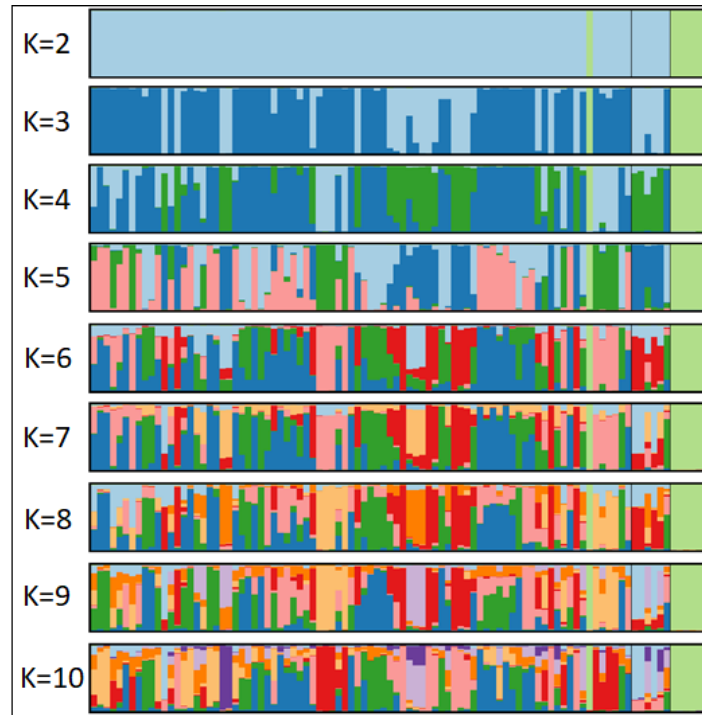
Anexo 1. Descripción de colecta de las líneas de selección. En la tabla se menciona cada código de muestra colectada, el nombre de la accesión, su origen y la región de donde se colectó.

Muestra	Accesión	Origen	Región
Q01	Javi	Centro	Bernardo O'Higgins
Q02	Javi	Centro	Bernardo O'Higgins
Q03	Cancosa	Altiplano	Tarapacá
Q04	Cáhuil	Centro	Bernardo O'Higgins
Q05	Cancosa	Altiplano	Tarapacá
Q06	U de C9	Centro	Maule
Q07	Palmilla	Centro	Bernardo O'Higgins
Q08	Palmilla	Centro	Bernardo O'Higgins
Q09	R49	Altiplano	Tarapacá
Q10	U de C9	Centro	Maule
Q11	R49	Altiplano	Tarapacá
Q12	Peñablanca-VI	Centro	Bernardo O'Higgins
Q13 (Q112)	Dorada P Paredones	Centro	Bernardo O'Higgins
Q14	Mix	Altiplano	Tarapacá
Q15	Peñablanca-VI	Centro	Bernardo O'Higgins
Q16	Dorada P Paredones	Centro	Bernardo O'Higgins
Q17	Mix	Altiplano	Tarapacá
Q18	Cáhuil	Centro	Bernardo O'Higgins
Q19	Villarrica	Centro-Sur	La Araucanía
Q20	Villarrica	Centro-Sur	La Araucanía
Q21	KM21	Centro-Sur	La Araucanía
Q22	KM23	Centro-Sur	La Araucanía
Q23	KM23	Centro-Sur	La Araucanía
Q24	KM30	Centro-Sur	La Araucanía
Q25	CHENO 042	Centro	Maule
Q26	CHENO 046	Centro	Bernardo O'Higgins
Q27	CHENO 046	Centro	Bernardo O'Higgins
Q28 (Q100)	JAVI	Centro	Bernardo O'Higgins
Q29	CHENO 207	Centro	Bernardo O'Higgins
Q30	CHENO 207	Centro	Bernardo O'Higgins
Q31	FARO	Centro	Bernardo O'Higgins
Q32	FARO	Centro	Bernardo O'Higgins

Continuación Anexo 1.

Q33	EM10-1	Centro	Araucanía
Q34	EM10-1	Centro	Araucanía
Q35	EMPO 10-17	Centro	Bernardo O'Higgins
Q36	EMPO 10-15	Centro	Bernardo O'Higgins
Q37	EMPO 10-14	Centro	Bernardo O'Higgins
Q38	EMPO 10-14	Centro	Bernardo O'Higgins
Q39	EMPO 10-10	Centro	Bernardo O'Higgins
Q40	EMPO 10-9	Centro	Bernardo O'Higgins
Q41	EMPO 10-8	Centro	Bernardo O'Higgins
Q42	EMPO 10-7	Centro	Bernardo O'Higgins
Q43	EMPO 10-6	Centro	Bernardo O'Higgins
Q44	EMPO 10-5	Centro	Bernardo O'Higgins
Q45	EMPO 10-4	Centro	Bernardo O'Higgins
Q46	EMPO 10-2	Centro	Bernardo O'Higgins
Q47	EMPO 10-1	Centro	Bernardo O'Higgins
Q48	PJEV 029	Centro	Maule
Q49	PJEV 028	Centro	Maule
Q50	PJEV 027	Centro	Maule
Q51	PJEV 026	Centro	Maule
Q52	PJEV 025	Centro	Maule
Q53	PJEV 006	Centro	Bernardo O'Higgins
Q54	PJ001	Centro	Bernardo O'Higgins
Q55	PJ002	Centro	Bernardo O'Higgins
Q56	PJEV 007	Centro	Bernardo O'Higgins
Q57	PJEV 008	Centro	Bernardo O'Higgins
Q58	PJ003	Centro	Bernardo O'Higgins
Q59	PJ005	Centro	Bernardo O'Higgins
Q60	PJEV 009	Centro	Bernardo O'Higgins
Q61	PJEV010	Centro	Bernardo O'Higgins
Q62	EAM 1	Centro	Maule
Q63	EAM 1	Centro	Maule
Q64	EAM 1	Centro	Maule

Continuación Anexo 1.			
Q65	EAM 2	Centro	Maule
Q66	PJEV 011	Centro	Maule
Q67	PJEV 012	Centro	Maule
Q68	EAM 3	Centro	Bernardo O'Higgins
Q69	EAM 4	Centro	Bernardo O'Higgins y Maule
Q70	PJEV 013	Centro	Maule
Q71	EAM 5	Centro	Bernardo O'Higgins
Q72	PJEV 014	Centro	Maule
Q73	PJEV 015	Centro	Maule
Q74	JML01	Centro	Maule
Q75 (Q103)	Cáhuil	Centro	Bernardo O'Higgins
Q76	PRJ3	Centro	Bernardo O'Higgins
Q77	PRJ3	Centro	Bernardo O'Higgins
Q78	PJEV 016	Centro	Maule
Q79	PJEV 017	Centro	Maule
Q80 (Q110)	Palmilla	Centro	Bernardo O'Higgins
Q81	PJEV 018	Centro	Maule
Q82	PJEV 019	Centro	Maule
Q83	PJEV 020	Centro	Maule
Q84	Dorada y Paredones	Centro	Bernardo O'Higgins
Q85	PJEV 021	Centro	Maule
Q86	PJEV 022	Centro	Maule
Q87	Roja Paredones	Centro	Bernardo O'Higgins
Q88	PJEV 003	Centro	Bernardo O'Higgins
Q89	PJEV 003	Centro	Bernardo O'Higgins
Q90 (Q196)	PJEV 023	Centro	Maule
Q91	PJEV 023	Centro	Maule
Q92	PJEV 023	Centro	Maule
Q93	PJEV 024	Centro	Maule
Q94	PJEV 024	Centro	Maule
Q95	PJEV 005	Centro	Bernardo O'Higgins
Q96	PJEV 005	Centro	Bernardo O'Higgins



Anexo 2. Determinación del valor óptimo de k subpoblaciones de acuerdo a la localidad geográfica de colección. Se pueden observar 9 gráficas que representan los valores de k de 2 a 10. Las líneas de selección avanzada se clasificaron de acuerdo a la región en la cual fueron colectadas. Los colores representan el *background* genético que posee cada individuo de acuerdo al valor de k analizado.

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
2	6	-4085.783333	26.611082	—	—	—
3	6	-3758.583333	5.146423	327.200000	109.016667	21.182999
4	6	-3540.400000	12.340016	218.183333	91.633333	7.425706
5	6	-3413.850000	12.434589	126.550000	44.466667	3.576046
6	6	-3331.766667	11.485411	82.083333	24.600000	2.141848
7	6	-3274.283333	88.720086	57.483333	9.133333	0.102945
8	6	-3207.666667	20.186596	66.616667	25.166667	1.246702
9	6	-3166.216667	127.809865	41.450000	38.300000	0.299664
10	6	-3163.066667	138.193584	3.150000	2.250000	0.016282
11	6	-3162.166667	327.245484	0.900000	66.033333	0.201785
12	6	-3227.300000	509.164465	-65.133333	98.200000	0.192865
13	6	-3194.233333	160.893986	33.066667	25.866667	0.160768
14	6	-3135.300000	190.146733	58.933333	88.533333	0.465605
15	6	-3164.900000	316.212859	-29.600000	—	—

Anexo 3. Resumen de obtención de k óptimo en las líneas de selección avanzada de quínoa. El valor de k seleccionado en el análisis se representa destacado en amarillo considerando los valores de Mean LnP(K), Stdev LNP(K), LN'(K),|Ln''(K)| y Delta K propios de la interfaz “Structure Harvester”.